



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/10, C07K 14/47, A61K 48/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/11208 (43) Date de publication internationale: 19 mars 1998 (19.03.98)
---	----	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01594

(22) Date de dépôt international: 10 septembre 1997 (10.09.97)

(30) Données relatives à la priorité:
96/11075 11 septembre 1996 (11.09.96) FR

(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant (US seulement): CAVALLINI, Bruno [FR/FR]; 13, rue Sainte-Cécile, F-67100 Strasbourg (FR).

(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).

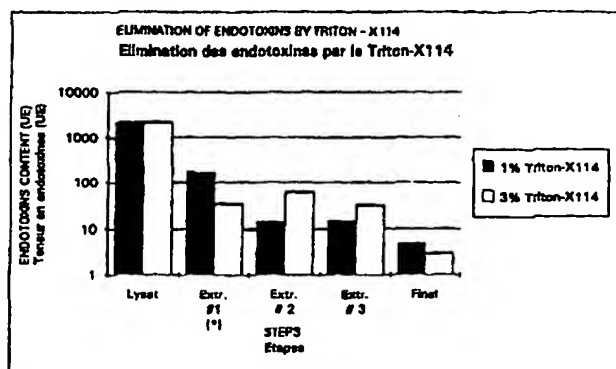
(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.
Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A PLASMID DNA

(54) Titre: PROCÉDE DE PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE



LEGEND
Légende : Lysat Extr. 1(1°) Extr. 2 Extr. 3 Final.

INITIAL ALKALINE LYSATE
Après la 1ère extraction par le Triton X-114
Après la 2ème extraction par le Triton X-114
Après la 3ème extraction par le Triton X-114
Produit final après précipitation alcoolique

AFTER 1st EXTRACTION BY TRITON X-114
AFTER 2nd EXTRACTION BY TRITON X-114
AFTER 3rd EXTRACTION BY TRITON X-114
FINAL PRODUCT AFTER ALCOHOL PRECIPITATION

(57) Abstract

The invention concerns a method for preparing a plasmid DNA using a wet cell biomass comprising after resuspension of said biomass the following steps: alkaline lysis, high ionic strength acidification, elimination of solubles, endotoxin and contaminating RNA reduction, filtering gel chromatography and conditioning. The invention also concerns a pharmaceutical composition containing a plasmid DNA and its use for gene therapy.

BEST AVAILABLE COPY

(57) Abrégé

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide comprenant après la resuspension de ladite biomasse, une étape de lyse alcaline, une étape d'acidification à force ionique élevée, une étape d'élimination des insolubles, une étape de réduction des endotoxines et des ARN contaminants, une étape de chromatographie de gel de filtration et une étape de conditionnement. Elle a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique ainsi préparé et son utilisation à des fins de thérapie génique.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	B Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

PROCEDE DE PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE

La présente invention a pour objet un nouveau protocole de purification d'ADN plasmidique permettant de produire en grande quantité un ADN d'une qualité pharmaceutique acceptable pour une utilisation chez l'homme. Elle concerne également une composition pharmaceutique comprenant l'ADN ainsi obtenu et son utilisation pour le transfert d'un acide nucléique dans une cellule hôte. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique.

Le transfert de gènes dans une cellule donnée est à la base même de la thérapie génique. Cette nouvelle technologie dont le champ d'application est vaste, permet d'envisager le traitement de maladies graves pour lesquelles les alternatives thérapeutiques classiques sont peu efficaces voire inexistantes et concerne aussi bien les maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, myopathie....) qu'acquises (cancer, syndrome d'immunodéficience acquise SIDA, ...). L'approche la plus pratiquée consiste à utiliser un véhicule viral pour introduire l'acide nucléique thérapeutique dans la cellule à traiter et, en particulier, rétroviral et adénoviral. En effet, les virus ont développé des mécanismes sophistiqués pour traverser les membranes cellulaires, échapper à la dégradation au niveau des lysosomes et faire pénétrer leur génome dans les noyaux afin d'assurer l'expression du gène thérapeutique. Cependant, l'approche virale a ses limitations, notamment une capacité de clonage restreinte, une production potentielle de particules virales compétentes pour la replication susceptibles de dissémination dans l'organisme hôte et l'environnement, un risque de mutagenèse insertionnelle dans le cas des vecteurs rétroviraux et, pour ce qui est des vecteurs adénoviraux, une induction de réponses immunitaires et inflammatoires chez l'hôte qui entravent les répétitions de traitement. Ces inconvénients importants dans le cadre d'un usage humain justifient la recherche de systèmes alternatifs de transfert d'acides nucléiques.

De plus en plus de méthodes de transfert de gènes font appel à des vecteurs non viraux. Une des plus employées consiste à délivrer l'acide nucléique thérapeutique au moyen de vecteurs synthétiques, tels que les lipides cationiques qui interagissent spontanément avec l'acide nucléique pour former des complexes chargés positivement capables de fusionner avec les membranes cellulaires anioniques et faire pénétrer l'acide nucléique qu'ils

transportent (voir par exemple Behr, Bioconjugate Chemistry (1994) 5 : 382). Une méthode dite biolistique ("gene gun") par bombardement des cellules par des microprojectiles métalliques recouverts d'ADN a été récemment employée dans le cadre d'un essai anti-SIDA (Woffendin et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2889-2894). Enfin, une approche
5 encore plus simple peut également être envisagée par administration directe de l'ADN nu, notamment dans le cadre des maladies touchant les muscles par injection intramusculaire. Ces méthodes non virales mettent généralement en oeuvre un vecteur plasmidique portant le gène thérapeutique et les éléments nécessaires à son expression.

La réalisation d'essais cliniques reposant sur des méthodes non virales nécessite de
10 pouvoir produire des quantités importantes d'ADN plasmidique de qualité pharmaceutique. Les méthodes classiquement utilisées ne sont pas optimales puisqu'elles utilisent des enzymes d'origine animale (lysozyme, protéinase, ribonucléase...), des solvants organiques connus pour leur toxicité (phénol, chlorophorme) et des composés mutagènes (bromure d'éthidium) susceptibles de contaminer le produit final. De plus, leur mise en oeuvre à l'échelle
15 industrielle est difficilement réalisable.

Les demandes internationales WO95/21250 et WO96/02658 décrivent des procédés de préparation d'ADN plasmidique sous forme purifiée utilisables pour des essais humains. Cependant, il est connu que diverses variables peuvent influencer l'efficacité de méthodes préparatives, notamment le plasmide à purifier, sa taille, le microorganisme qui le produit,
20 les conditions et le milieu de fermentation. Dans ce contexte, il est avantageux de pouvoir disposer d'une nouvelle méthode pour la production de grandes quantités d'ADN plasmidique de qualité pharmaceutique.

On a maintenant trouvé une nouvelle méthode de préparation d'ADN plasmidique
25 comprenant une succession d'étapes simples à mettre en oeuvre, évitant l'usage de produits d'origine animale, toxiques et mutagènes tels que ceux cités ci-avant et adaptables à l'échelle industrielle. L'ADN est produit avec un rendement élevé, sous forme substantiellement pure et d'une qualité compatible avec un usage humain. Les contaminations résiduelles par les protéines, endotoxines, ARN et ADN génomique du microorganisme producteur sont
30 particulièrement faibles voire non détectables par les techniques standards de détection. Les exemples qui suivent montrent également que ce procédé permet la purification de manière

efficace d'un plasmide de grande taille incorporant l'ADNc de la dystrophine destiné au traitement de la myopathie de Duchenne.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un procédé pour préparer un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide récoltée après fermentation d'une cellule productrice comprenant ledit ADN plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) lyse alcaline de la biomasse resuspendue, après resuspension de la biomasse cellulaire humide
- b) acidification à force ionique élevée,
- 10 c) élimination des insolubles,
- d) réduction des endotoxines et des acides ribonucléiques (ARN),
- e) chromatographie de gel filtration, et
- f) conditionnement.

15 Au sens de la présente invention "ADN plasmidique" désigne un élément cellulaire extrachromosomique formé d'une molécule d'ADN généralement circulaire capable de replication autonome dans une cellule productrice (la cellule dans laquelle il est amplifié). Le choix des plasmides utilisables dans le procédé de la présente invention est vaste. Ils peuvent être d'une origine quelconque (procaryote, eucaryote) ou être formés par

20 l'assemblage d'éléments variés. D'une manière générale, les plasmides sont connus de l'homme de l'art. Un grand nombre d'entre eux sont disponibles commercialement mais, il est également possible de les construire par les techniques de manipulation génétique (Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Il peut s'agir d'un vecteur de clonage ou d'expression dérivé par

25 exemple de pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagène), pREP4, pCEP4 (Invitrogene) ou encore p Poly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201).

Avantageusement, un plasmide mis en oeuvre dans le cadre de la présente invention possède les éléments génétiques qui lui permettent de se répliquer de manière autonome dans la cellule productrice et, de manière optionnelle, dans une cellule hôte (cellule dans

30 laquelle l'effet thérapeutique est recherché). De tels éléments peuvent être constitués entre autre par une origine de replication assurant l'initiation de la replication dans une bactérie,

une levure, un champignon ou une cellule mammifère. Elle peut être isolée d'un procaryote (ColE1...), d'un eucaryote (2 μ ou ARS pour séquence à replication autonome), d'un virus (SV40 ori du virus simien 40, oriP du virus Epstein Barr EBV...) ou d'un bactériophage (flori...). Le choix de l'origine de replication appropriée est à la portée de l'homme de l'art.

5 Par exemple, pour un plasmide destiné à être produit dans le microorganisme *Escherichia coli* (*E. coli*), on retiendra l'origine ColE1. De plus, si l'on désire qu'il soit autoreplicatif dans une cellule hôte mammifère, il comprendra également une origine fonctionnelle chez un eucaryote par exemple oriP et pourra inclure le gène codant pour la protéine EBNA-1 du virus EBV nécessaire à la replication à partir de cette dernière (Lupton et Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5, 2533-2542 ; Yates et al., Nature 313, 812-815).

10 Par ailleurs, un plasmide en usage dans la présente invention peut en outre comprendre un gène de sélection permettant de sélectionner ou identifier les cellules transfectées (cellules productrices et/ou cellules hôtes). On peut appliquer les méthodes de sélection reposant sur le principe de cellules productrices déficientes (par mutations
15 auxotrophes ou introduction d'un gène léthal) incapables de pousser en l'absence d'un plasmide portant un gène complétant cette déficience (par exemple système dap décrit dans la demande EP 0 258 118, complémentation d'une mutation d'auxotrophie, usage de gènes codant pour un tARN suppresseur sup E, supF...). Une autre pratique couramment
20 employée consiste à intégrer dans le plasmide un gène codant pour la résistance à un antibiotique (ampicilline, kanamycine, tétracycline...). Bien entendu, il peut comprendre des éléments supplémentaires améliorant son maintien et/ou sa stabilité dans une cellule hôte ou productrice. A cet égard, on peut citer la séquence *cer* dont la présence favorise le maintien monomérique d'un plasmide (Summers et Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103) et certaines
25 séquences d'origines virales (LTR de rétrovirus, ITR d'un virus associé à l'adénovirus ...) ou cellulaires permettant l'intégration dans les chromosomes de la cellule hôte.

Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, un plasmide en usage dans la présente invention est destiné à transporter un ou plusieurs gène(s) d'intérêt thérapeutique dans une cellule hôte. D'une manière générale, le gène d'intérêt peut coder pour un ARN antisens, un ARN messager qui sera ensuite traduit en polypeptide d'intérêt,
30 un ribozyme ou encore un ARN conférant un bénéfice thérapeutique direct (ARN VA d'un adénovirus capable de réprimer la réponse immunitaire, ARN activant la synthèse

d'interféron) (Abbas et al. in Cellular and Molecular Immunology ; W.B., Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich, Inc. p. 228).

Le gène d'intérêt peut être isolé par toute technique conventionnelle telle que clonage, PCR (Polymerase Chain Reaction) ou encore synthétisé chimiquement. Il peut être de type génomique (muni d'un ou plusieurs introns) ou ADN complémentaire (ADNc). Le polypeptide d'intérêt peut être constitué par une protéine mature, un précurseur et, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant un peptide signal, une protéine tronquée, une protéine chimère provenant de la fusion de séquences d'origines diverses ou encore une protéine mutée présentant des propriétés biologiques améliorées et/ou modifiées.

A titre d'exemples, on peut avoir recours à un gène d'intérêt sélectionné parmi ceux codant pour les polypeptides suivants :

- cytokines ou lymphokines (interférons α , β et γ , interleukines et notamment l'IL-2, l'IL-6, l'IL-10 ou l'IL-12, facteurs nécrosant des tumeurs (TNF), facteurs stimulateurs de colonies (GM-CSF, C-CSF, M-CSF...) ;
- récepteurs cellulaires ou nucléaires, notamment ceux reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites) et, de préférence, par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) ou leurs ligands ;
- protéines impliquées dans une maladie génétique (facteur VII, facteur VIII, facteur IX, dystrophine ou minidystrophine, insuline, protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), hormones de croissance (hGH) ;
- enzymes (uréase, rénine, thrombine....) ;
- inhibiteurs d'enzymes (α 1-antitrypsine, antithrombine III, inhibiteurs de protéases virales...) ;
- polypeptides à effet anti-tumoral capables d'inhiber au moins partiellement l'initiation ou la progression de tumeurs ou cancers (ARN anti-sens, anticorps, inhibiteurs agissant au niveau de la division cellulaire ou des signaux de transduction, produits d'expression des gènes suppresseurs de tumeurs, par exemple p53 ou Rb, protéines stimulant le système immunitaire....) ;
- protéines du complexe majeur d'histocompatibilité des classes I ou II ou protéines

- régulatrices agissant sur l'expression des gènes correspondants ;
- polypeptides capables d'inhiber une infection virale, bactérienne ou parasitaire ou son développement (polypeptides antigéniques ayant des propriétés immunogènes, épitopes antigéniques, anticorps, variants trans-dominants susceptibles d'inhiber l'action d'une protéine native par compétition...) ;
 - toxines (thymidine kinase de virus simplex de l'herpès 1 (TK-HSV-1), ricine, toxine cholérique, diphtérique.....) ou immunotoxines ; et
 - marqueurs (β -galactosidase, luciférase.....).

Bien entendu, le gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression dans la cellule hôte. Par "éléments nécessaires à son expression", on désigne l'ensemble des éléments permettant sa transcription en ARN et la traduction d'un ARNm en polypeptide. Parmi ceux-ci le promoteur revêt une importance particulière. Il peut dériver d'un gène quelconque (eucaryote, viral, promoteur naturel du gène d'intérêt en question...) ou peut être artificiel. Par ailleurs, il peut être constitutif ou régula-
ble. Alternativement, il peut être modifié de manière à améliorer l'activité promotrice, supprimer une région inhibitrice de la transcription, modifier son mode de régulation, introduire un site de restriction, On peut mentionner, à titre d'exemples, les promoteurs viraux CMV (Cytomegalovirus), RSV (Rous Sarcoma Virus), du gène TK du virus HSV-1, précoce du virus SV40, adénoviral MLP, ..., ou encore les promoteurs eucaryotes des gènes PGK (Phospho Glycerate kinase) murin ou humain, α 1-antitrypsine (foie-spécifique), immunoglobulines (lymphocyte-spécifique).

De tels éléments peuvent également comprendre des éléments additionnels tels que introns, séquence signal, séquence de localisation nucléaire, séquence terminatrice de la transcription (polyA), site d'initiation de la traduction de type IRES ou autre, etc.

Un plasmide en usage dans la présente invention est amplifié dans une cellule productrice avant d'être purifié selon le procédé de la présente invention. On préfère tout particulièrement les bactéries gram négatif et, notamment, *E. coli*. A titre indicatif, on peut citer les souches DH5 (Grant et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649), MC1061 (Wertman et al., 1986, Gene 49, 253-262) et ses dérivées comme DH10B (Grant et al., 1990, *supra*). Etant donné qu'il s'agit d'une technologie largement connue à ce jour,

il ne sera procédé qu'à une description brève de la manière d'opérer pour introduire un plasmide dans une bactérie et l'amplifier. Toutes les techniques conventionnelles peuvent être employées dans le cadre de la présente invention (traitement par les chlorures de calcium, de rubidium, d'hexamine cobalt, par des agents réducteurs, par le DMSO, électroporation, transduction, liposomes, ... ; Maniatis et al., 1989, *supra*). Les cellules productrices ainsi transformées sont ensuite cultivées selon les pratiques générales de l'art (fermentation en continue "batch" ou alimentée "fed batch"). Les conditions de culture peuvent être facilement établies par l'homme du métier sur la base des connaissances générales dans ce domaine et du système de sélection porté par le plasmide. Leur récolte est effectuée selon les techniques habituelles, comme la filtration ou encore la centrifugation à faible vitesse, pour générer la biomasse cellulaire humide laquelle peut, à ce stade, être congelée ou stockée à 4°C avant d'être soumise au procédé selon l'invention.

Selon le procédé de l'invention, on effectue la lyse de la biomasse cellulaire humide après avoir procédé à sa resuspension. On emploie généralement un tampon de resuspension légèrement basique pour neutraliser le caractère acide de la pâte cellulaire et de force ionique faible ne présentant pas ou peu d'effets lytiques sur les cellules transformées. Sa composition et son pH peuvent varier en particulier en fonction de la cellule productrice, du milieu de culture employé ou tout autre paramètre. L'homme de l'art est en mesure d'élaborer un tampon de resuspension approprié. On peut citer à titre d'exemple un tampon contenant de l'EDTA (concentration de 1 à 50 mM, de préférence 10 mM) et du Tris-HCl (concentration de 10 à 100 mM, de préférence 50 mM) tamponné à un pH d'environ 8. Les cellules peuvent être resuspendues par tout moyen technique habituel tel que agitation rectilinéaire, pipetage répété et/ou homogénéisateur (vortex, homogénéisateur par cisaillement...).

L'étape de lyse alcaline permet de libérer le contenu cellulaire et en solubiliser tous les composants. Protéines, ARN et ADN sont dénaturés y compris l'ADN plasmidique dont les deux brins homologues restent enchevêtrés, à la différence de l'ADN génomique. Il peut être avantageux d'effectuer la lyse alcaline en présence d'un détergent et, de préférence, d'un tensioactif anionique. Le choix de la base et du tensioactif n'est pas limité. A cet égard, la combinaison soude et SDS (sodium dodécylsulfate) est préférée, notamment à des concentrations finales aux environs de 0,1 M et 0,5 % respectivement. Le pH final de la

solution de lyse est, de préférence, compris entre 11 et 13 et, de manière optimale, entre 12,2 et 12,4. On indique qu'il est préférable de mélanger les cellules transformées resuspendues et la solution de lyse d'une manière douce, par exemple par inversion, afin de minimiser les cassures de l'ADN cellulaire génomique qui serait alors susceptible de contaminer la préparation d'ADN plasmidique. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un mode préféré, il est néanmoins possible dans le cadre de la présente invention de faciliter la lyse cellulaire par chauffage à température élevée (voir par exemple la demande internationale WO96/02658) ou l'emploi d'enzymes animales dégradant les membranes cellulaires (lysozyme...).

La seconde étape du procédé selon l'invention résulte en une acidification à haute force ionique du lysat obtenu précédemment. L'acidification se fait de préférence d'une manière brutale, c'est à dire en une seule fois. Dans ces conditions, l'ADN plasmidique est renaturé rapidement alors que la grande majorité des protéines, de l'ADN génomique dénaturé et des espèces d'ARN insolubles en condition de force ionique élevée flocculent. Dans le cadre de la présente invention, on met en oeuvre une solution comprenant un tampon ou un acide fort combiné à un sel dont le pH est compris entre 4,5 et 6,5. Selon un mode de réalisation avantageux, on utilise une solution d'acétate de potassium de préférence, à une concentration finale proche de 1 M, de manière à obtenir un pH final d'environ 5,1. Mais, on aurait également pu avoir recours à une solution d'acétate de sodium de pH et de concentration tels qu'indiqués ci-dessus.

On procède ensuite à l'élimination des insolubles constitués par les débris cellulaires et les floculats de macromolécules. Ceci peut être réalisé par toute technique conventionnelle de filtration ou centrifugation. Il peut être judicieux d'éliminer la majorité des insolubles d'abord par centrifugation puis de poursuivre la clarification par filtration. De nombreux filtres peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention à la condition qu'ils retiennent les insolubles et laissent passer l'ADN plasmidique. Avantageusement, le filtre choisi aura une porosité comprise entre 1 et 100 μm , plus avantageusement 2 et 75 μm , de préférence 5 et 75 μm , de manière tout à fait avantageuse, 3 et 50 μm , et, de manière tout à fait préférée, 10 et 50 μm . Il peut être en matière synthétique comme le nylon, organique comme la cellulose ou non organique comme le verre. Selon un mode de

réalisation avantageux, on procède à des filtrations successives à l'aide de filtres de porosités décroissantes, par exemple une première filtration sur verre fritté d'une porosité comprise entre 100 et 40 μm (fritté N° 2, Schott AG), la seconde sur fritté de porosité 16 à 40 μm (fritté N° 3, Schott AG) et la dernière sur fritté de porosité 10 à 16 μm (fritté N° 4, Schott AG).

Selon une autre variante, il est possible de procéder à une seule filtration en utilisant une cartouche en polypropylène Sartopure PP de porosité 8 μm (Réf. 552 1302 P9-00-A) ou Sartopure PP2 de porosité 3 μm (Réf. 559 1302 P9-00-A).

Selon un mode de réalisation optionnel mais particulièrement avantageux, le filtrat peut être concentré avant l'étape suivante de réduction des endotoxines. Les moyens de concentrer un ADN dissous dans une solution aqueuse sont connus de l'homme de l'art. On peut citer l'ultrafiltration, la précipitation alcoolique ou encore une combinaison de ces deux techniques.

En ce qui concerne l'ultrafiltration, diverses membranes peuvent être employées du moment qu'elles n'adsorbent pas ou peu l'ADN plasmidique dans les conditions d'utilisation. On aura avantageusement recours à des membranes dont le seuil de coupure est compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa. Elles peuvent être de compositions variées, organiques ou non (poly(ether)sulfone, acetate de cellulose, ...). Les membranes particulièrement adaptées sont celles de type YM (et notamment, YM30-76, Diaflo et YM30-4208, Centricon), celles équipant les unités Easy Flow (référence 14669-OS-1V ou 14669-OS-2V, Sartorius) ou encore minipellicon 2 PL300 (Millipore en cellulose régénérée). L'ultrafiltration constitue à cette étape un moyen puissant de réduire la contamination de la préparation d'ADN plasmidique par des pigments d'origine cellulaire ou provenant du milieu de culture.

Il est également possible de concentrer les acides nucléiques par précipitation alcoolique en présence d'éthanol ou d'isopropanol. Les paramètres de précipitation tels que volume d'alcool à ajouter, température, présence de cations monovalents ainsi que la récupération du matériel précipité sont détaillés dans de nombreux ouvrages accessibles à l'homme du métier. En particulier, la précipitation par l'isopropanol présente l'avantage de réduire encore la teneur en pigments, certains d'entre eux étant solubles dans la phase alcoolique.

Selon un mode préféré, le filtrat est en premier lieu concentré par ultrafiltration sur membrane polysulfone ayant un seuil de coupure d'environ 100 kDa à l'aide d'une unité de type Easy Flow (Sartorius) à usage unique ou sur membrane minipellicon 2 PL300 (Millipore) présentant un seuil de coupure d'environ 300 kDa. Une fois le volume réduit d'un facteur 5 à 20, les acides nucléiques sont précipités par addition de 0,7 volume d'isopropanol. Le matériel précipité est récupéré par centrifugation et peut être soumis à un ou plusieurs lavages dans l'éthanol à une concentration de 70 à 80 % afin de réduire les contaminants solubles dans l'alcool tels que les sels et, comme déjà mentionné, les pigments résiduels. Après séchage, les acides nucléiques sont repris dans un tampon approprié, par exemple du Tris-HCl 10 mM pH 8 contenant de l'EDTA à une concentration d'environ 1 mM pour inhiber les nucléases et de manière optionnelle de l'acétate de sodium (à une concentration finale d'environ 0,3 M permettant la précipitation des acides nucléiques après l'étape d'extraction au Triton). Il est intéressant de noter ici que les étapes d'ultrafiltration et de précipitation à l'isopropanol sont particulièrement avantageuses pour éliminer la majorité des pigments de la préparation.

A ce stade, la préparation d'ADN plasmidique contient des quantités importantes d'ARNs et d'endotoxines et les étapes suivantes consistent en une réduction de leurs taux. Par réduction, on entend une diminution notable du taux d'endotoxines ou d'ARN entre le début et la fin de l'étape, d'un facteur d'au moins 100 et, de préférence, d'au moins 1000. La concentration en ARN et endotoxines peut être appréciée par des essais semblables à ceux décrits ci-après ou par tout autre méthodologie divulguée dans la littérature. Bien que les étapes puissent être permutées, on préfère en premier lieu agir sur les endotoxines puis sur les ARNs.

Les endotoxines du fait de leur caractère pyrogène, doivent être considérablement réduites voire éliminées avant d'envisager une administration chez l'homme. En ce qui concerne les produits pharmaceutiques courants, la quantité maximale tolérable a été fixée par les autorités sanitaires à 5 unités (EU) par dose. Or, il a été montré que les procédés courants de préparation d'ADN plasmidique (ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium, chromatographie échangeuse d'anions, ...) laissent subsister de grandes quantités d'endotoxines (Cotten et al., 1994, *Gene Therapy* 1, 239-246).

Aux fins de la présente invention, on préférera avoir recours à une extraction en présence d'un détergent non ionique ayant un point nuage compris entre 15°C et 35°C, avantageusement 18°C et 30°C et, de préférence, 20°C et 25°C. Un détergent préféré est choisi parmi les polyoxyéthylènes. Des exemples de détergents utilisables selon la présente invention sont décrits dans le tableau suivant :

Détergent	Point nuage (°C)	Densité (20°C)	Formule	Fourn.
Brij58	45°C	-	$C_{16}H_{33} (OCH_2CH_2)_{20}OH$	ICI Americas
Triton™X-114	22°C	1,054	$(CH_3)_3C-CH_2-C(CH_3)_2-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7.8}OH$	Sigma
Tergitol™ TMN6	37°C	1.009	$C_{12}H_{25} (OCH_2CH_2)_8OH$	Sigma
Tergitol™ NP7	41°C	1,048	$C_9H_{19}-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7.8}OH$	Sigma
Tergitol™ Min-Foam 1X	40°C	0,995	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x$ [CH ₂ CH ₂ O/CH ₂ CH(CH ₃)O] _y CH ₂ CH(CH ₃)OH	Sigma
Tergitol™ Min-Foam 2X	20°C	0,978	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x$ [CH ₂ CH ₂ O/CH ₂ CH(CH ₃)O] _y CH ₂ CH(CH ₃)OH	Sigma

Les composés décrits précédemment sont des composés amphiphiles dont la miscibilité dans la phase aqueuse peut être contrôlée par variation de la température autour de leur point nuage. Avantageusement, selon le procédé de l'invention, la préparation d'ADN est refroidie à une température inférieure à 10°C avant d'ajouter ledit détergent. La concentration finale en détergent à utiliser peut être comprise entre 0,5 et 6%, avantageusement entre 1 et 5% et, de manière tout à fait préférée, aux environs de 1%. Dans ces conditions, ledit détergent est soluble dans l'eau et forme des micelles complexant les endotoxines. Après incubation et centrifugation du mélange ADN plasmidique / détergent à une température nettement supérieure au point nuage (par exemple >37°C dans le cas du Triton™ X-114), il y a séparation de deux phases : une phase aqueuse contenant l'ADN plasmidique et une phase contenant le détergent et les endotoxines. Lorsque le détergent choisi possède une densité supérieure à celle de la solution d'ADN, après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse est localisée dans la partie supérieure du tube et la phase contenant le détergent et les endotoxines dans la partie inférieure, et inversement lorsque le détergent possède une densité inférieure à celle de la solution d'ADN. Pour des raisons techniques évidentes, on choisira de préférence un détergent ayant une densité supérieure à celle de la solution d'ADN. L'homme du métier dispose en outre des connaissances nécessaires lui permettant d'ajuster, si nécessaire, la densité de la solution d'ADN, en modifiant par exemple la concentration saline de ladite solution. Le procédé selon l'invention peut comprendre une ou plusieurs (de préférence 3) extractions successives telles que décrites ci-dessus.

Selon la présente invention, un détergent préféré est constitué par le Triton™ X-114 (octoxynol ou octylphenoxy-poly(éthylèneglycoéther)_n avec n=7 ou 8) dont le point nuage est environ 20°C et la densité environ 1,06.

La présente invention concerne également une variante du procédé de l'invention selon laquelle le détergent non ionique choisi présente un point nuage situé en dehors de la gamme préconisée, et selon laquelle ladite température nuage est ajustée par l'addition d'une faible quantité d'un détergent anionique («Nonionic Surfactants», Chapter «Surfactant and Detersive Systems» in Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemistry, John WILEY & Sons, 1995).

Selon une variante intéressante du procédé selon l'invention, la réduction des endotoxines est suivie d'une étape de précipitation alcoolique de l'ADN plasmidique par incubation au froid (4°C, -20°C ou -80°C) en présence de 0,3 M d'acétate de sodium et environ 70 % d'éthanol. Le précipitat d'acide nucléique est récupéré classiquement par centrifugation. Il peut être lavé par une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau avant d'être séché et redissous en milieu aqueux comme par exemple du Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM. Cette étape de précipitation, par ailleurs optionnelle, offre un moyen efficace d'éliminer les traces de Triton™ X-114 résiduel.

La réduction de la contamination par les ARN peut être réalisée par tout moyen connu de l'art, par exemple l'hydrolyse enzymatique au moyen d'une ribonucléase d'origine animale telle que la ribonucléase A pancréatique bovine. Mais, dans le cadre de la présente invention, on préfère avoir recours à une précipitation sélective des ARN dans des conditions de haute force ionique ou en présence d'agents déshydratants. Divers sels peuvent être utilisés et on mentionnera à titre indicatif, le chlorure de lithium (Zelev Lev, 1987, *Analytical Biochemistry* 160, 332-336), le chlorure de calcium, l'acétate d'ammonium et le sulfate d'ammonium. A ce titre, le sulfate d'ammonium constitue un mode de réalisation préféré, particulièrement à une concentration finale comprise entre 1 et 3,5 M, de préférence, entre 1,5 et 3 M et, de manière tout à fait préférée, entre 2 et 2,5 M. Selon une autre variante de l'invention, on peut utiliser du chlorure de calcium à une concentration finale comprise entre 10 mM et 2 M, avantageusement entre 20 mM et 0,5 M, et de manière préférée entre 50 mM et 0,1 M. D'une manière optimale, après l'ajout du sel ou de la solution saline, le mélange est laissé sous agitation faible, éventuellement à température basse, pendant une durée variable (1 à 120 min), centrifugé et l'ADN plasmidique récupéré dans le surnageant.

Le procédé selon l'invention comprend à ce stade une étape de chromatographie d'exclusion sur supports de gel filtration, qui permet de parfaire la purification de la préparation d'ADN plasmidique (réduction des ARNs et protéines résiduels) et également d'assurer le dessalage. Le choix du support est large et à la portée de l'homme de l'art. On retiendra plus particulièrement, les supports agréés pour un usage humain ou vétérinaire par les autorités compétentes américaines (FDA pour Food and Drug Administration) et/ou les

agences de l'Union Européenne et présentant une limite d'exclusion élevée et, notamment, supérieure ou égale à 20×10^6 Da (telle que mesurée sur des polymères comme les dextrans). On peut citer par exemple les supports Séphacryl S500 HR (Pharmacia, référence 17-0613-01), S1000 SF (Pharmacia, référence 17-0476-01) et GF2000 (Biosepra, référence 260651).

5 Le support Séphacryl S500 est préféré dans le cadre de l'invention.

La colonne est initialement équilibrée dans des conditions salines limitant les interactions hydrophobes entre le support et l'ADN. Avantageusement, on utilise le tampon TEN (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, et NaCl 100 mM). Les conditions de chromatographie peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres et notamment
10 du volume de la colonne, du support choisi, de la concentration de la préparation en ADN plasmidique et de la taille de ce dernier. L'ADN plasmidique est exclu de la phase et est élué avant les contaminants de poids moléculaire inférieur. Les fractions le contenant peuvent être analysées par les techniques usuelles (absorbance à 254 nm, analyse visuelle après séparation par électrophorèse en gel d'agarose ...). Il est également possible de connecter
15 la colonne à un détecteur muni d'un filtre (à 254 nm par exemple) pour la détection en ligne des fractions positives. On notera qu'un avantage du procédé selon l'invention consiste en l'élimination au cours de cette étape, du sel résiduel issu de l'étape précédente.

Selon un mode de réalisation optionnel, les fractions obtenues après l'étape chromatographique peuvent être rassemblées et concentrées selon la méthodologie indiquée
20 ci-avant (ultrafiltration et/ou précipitation alcoolique).

Enfin, le procédé selon l'invention comprend une étape de conditionnement de la préparation d'ADN plasmidique. Les tampons de conditionnement utilisables dans le cadre de la présente invention sont variés. Il peut s'agir d'une solution saline physiologique (NaCl 0,9 %), d'une solution Hepes-Ringer, de Lactate-Ringer, de TE (Tris-HCl 10 mM pH7,5 à
25 8, EDTA 1 mM) ou simplement d'H₂O. De manière optionnelle, la préparation peut être soumise à une filtration stérilisante. On aura avantageusement recours à des filtres de 0,22 µm d'une surface adaptée au volume à traiter. On peut citer, par exemple, les unités de filtration de type Minisart (Sartorius, référence SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, référence 18053D), Millex GF (Millipore, référence SLGS025BS), Millex GV (Millipore, référence SLGV025BS), Millex GP (Millipore, référence SLGPR25LS), Anotop 25
30

(Whatman, référence 20025H-68092122), Anotop 25 Plus (Whatman, référence 2002AP-68094122), Sartobran 300 (référence 5231307H5p00V) ou Easy Flow 0,2 µm en acétate de cellulose (référence 12307-05-1-V). Puis, le filtrat est conditionné en doses ajustées à une concentration donnée.

5 La concentration en ADN plasmidique peut être déterminée de manière conventionnelle, par exemple par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm. La proportion relative des différents topoisomères peut être évaluée visuellement par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium éventuellement suivies d'une analyse densitométrique. L'intégrité du plasmide peut être vérifiée par digestion par
10 des enzymes de restriction ayant un ou plusieurs sites de coupure.

 La qualité de l'ADN plasmidique préparé par le procédé selon l'invention peut être appréciée par des essais standards tels que ceux qui sont décrits dans les exemples qui suivent. La contamination en ARN peut être évaluée visuellement par électrophorèse en gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium ou par spectrophotométrie après réaction à
15 l'orcinol chlorhydrique (réactif de Bial) (Moulé, 1953, Arch. Science Physiol. 7, 161 ; Meijbaum, 1939, Hope Seyler Z. 258, 117). Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de préférence une contamination résiduelle en ARN inférieure à 5 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 3 %, de préférence inférieure à 2 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 1 %.

20 La contamination résiduelle par les protéines peut être mesurée par toute technique de dosage des protéines ne montrant pas ou peu d'interférences dues à l'ADN. Une technique adéquate est celle de la technique du BCA (acide bicinchoninique) basée sur la détection spectrophotométrique à une longueur d'onde de 562 nm du complexe coloré formé entre le BCA et les ions Cu⁺ issus de la réduction en milieu alcalin d'ions cuivreux Cu⁺⁺ par
25 les protéines (Smith et al., 1985, Anal. Biochem. 150, 76-85). Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de préférence une contamination résiduelle en protéines inférieure à 3 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 2 %, de préférence inférieure à 1 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 0,5 %.

 Les techniques de dosage des endotoxines sont connues de l'homme du métier. On
30 peut par exemple procéder par un essai colorimétrique dérivé de la méthode du LAL (Limulus Amebocyte Lysate) recommandée par les pharmacopées de l'Union Européenne

et des Etats Unis, tel qu'il est mis en oeuvre dans les kits commerciaux (Bio-Whittaker, QCL-1000, référence L50-647-U ; Biogenic, COATEST, référence 82 2387). De préférence, la quantité d'entoxines de la préparation d'ADN plasmidique est inférieure à 50 EU, avantageusement inférieure à 20 EU, de préférence inférieure à 10 EU et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 5 EU par mg de plasmide.

L'ADN chromosomique contaminant peut être dosé par la technique de PCR quantitative compétitive basée sur l'amplification de séquences spécifiques du microorganisme producteur, par Southern ou encore par "Slot-blot" à l'aide d'une sonde spécifique. Un ADN plasmidique purifié selon le procédé de l'invention présente de préférence une contamination résiduelle en ADN chromosomique inférieure à 5 % (masse/masse), avantageusement inférieure à 3 %, de préférence inférieure à 2 % et, de manière tout à fait préférée, inférieure à 1 %.

Un procédé selon l'invention est particulièrement avantageux pour ce qui est de la préparation d'ADN plasmidique de taille supérieure à 10 kb.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique purifié par le procédé selon l'invention à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique. Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être utilisée dans divers types de cellules hôtes. Il s'agit de préférence d'une cellule de mammifère et, en particulier d'une cellule humaine. Ladite cellule peut être une cellule primaire ou tumorale d'une origine hématopoïétique (cellule souche totipotente, leucocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage, ...), hépatique, épithéliale, fibroblaste et, tout particulièrement, une cellule musculaire (myoblaste, myocyte, cellule satellite, cardiomyocyte, ...), une cellule trachéale ou pulmonaire. Par ailleurs, une composition selon l'invention peut comprendre un élément de ciblage vers une cellule particulière, par exemple un ligand à un récepteur cellulaire ou encore un anticorps. De tels éléments de ciblage sont connus.

Une composition selon l'invention peut être administrée par voie systémique ou par aérosol, en particulier par voie intragastrique, sous-cutanée, intracardiaque, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale, intratumorale intrapulmonaire, intranasale ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu ou de la maladie à traiter ou encore du ou

des gène(s) d'intérêt à transférer. En particulier, une composition pharmaceutique selon l'invention peut être formulée sous forme de doses comprenant entre 0,05 et 100 mg d'ADN plasmidique purifié selon le procédé selon l'invention, avantageusement 0,1 et 10 mg et, de préférence, 0,5 et 5 mg. La formulation peut également inclure d'autres composés tels qu'un adjuvant ou un excipient acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

Dans ce contexte, il peut être particulièrement avantageux d'associer l'ADN plasmidique à un composé améliorant sa diffusion, notamment un polymère ou un lipide cationique. A titre d'exemples, on mentionnera le 5-carboxyspermylglycine dioctadecylamide (DOGS), le 3β ([N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyl] cholestérol (DC-Chol), le (2,3-diolelylocyl-N-[2(sperminecarboxamido) éthyl] N, N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate) (DOSPA), la spermine cholestérol et la spermidine cholestérol (décrits dans la demande française 96 01347).

Par ailleurs, une telle composition peut en outre comprendre un adjuvant capable d'améliorer son pouvoir transfectant. Il s'agira de préférence d'un lipide neutre tel que les phosphatidyl éthanolamine, phosphatidyl choline, phosphatidyl sérine, phosphatidyl glycérol et, en particulier, la diolelyl phosphatidyl éthanolamine (DOPE). Il est également possible de combiner au complexe ADN plasmidique/lipide d'autres substances pour améliorer encore l'efficacité transfectionnelle ou la stabilité des complexes.

Une composition selon l'invention est en particulier, destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que maladies génétiques (hémophilie, mucoviscidose, diabète ou myopathies de Duchenne et de Becker, ...), cancers, maladies virales (hépatites, SIDA, ...), et maladies récurrentes (infections provoquées par le virus de l'herpès, le virus du papilloma humain, ...).

Enfin, la présente invention est relative à l'utilisation thérapeutique ou prophylactique d'une composition pharmaceutique selon l'invention pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal et, préférentiellement, par thérapie génique. Selon une première possibilité, le médicament peut être administré directement *in vivo* (par exemple par injection intraveineuse, intramusculaire, dans une tumeur accessible, dans les poumons par aérosol, ...). On peut également adopter l'approche *ex vivo* qui consiste à prélever des cellules du patient (cellules souches de la moëlle osseuse, lymphocytes du sang périphérique, cellules musculaires, ...), de les transfecter *in vitro* selon les techniques de l'art

et de les réadministrer au patient.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement mettant en oeuvre un ADN plasmidique obtenu par un procédé selon l'invention, selon laquelle on administre une quantité thérapeutiquement efficace de ce dernier à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux figures suivantes :

La Figure 1 illustre un chromatogramme après gel filtration sur Séphacryl S500 (colonne de 70 ml de diamètre 16 mm et longueur 350 mm) et chargement d'un échantillon de 2 ml contenant 5 mg de pCH110N obtenu après lyse alcaline, ultrafiltration et traitement au sulfate d'ammonium. L'élution est effectuée à 0,5 ml/min (15 cm/h) dans un tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. La densité optique est enregistrée à 254 nm.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG11025 comportant le gène conférant la résistance à la kanamycine (kana), l'origine de répllication de ColE1, le promoteur CMV (pCMV) du cytomégalo virus, l'intron du gène codant pour l'Hydroxy-Méthylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMG), l'ADNc codant pour la dystrophine et une séquence de polyadénylation des ARNs transcrits (pA).

La Figure 3 illustre un chromatogramme après gel filtration sur Séphacryl S500 (colonne de 5 litres de diamètre 8,9 cm et de longueur 82 cm) et chargement de 125 ml d'échantillon contenant 85 mg de pTG11025. L'élution est effectuée à environ 15 ml/min (14,5 cm/h) dans un tampon Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0.

La Figure 4 illustre l'élimination progressive des endotoxines d'un lysat alcalin par 3 extractions successives avec 1 % ou 3 % de Triton™ X-114 suivies d'une précipitation à l'éthanol.

La Figure 5 illustre la précipitation sélective des ARNs contaminants d'un lysat alcalin en présence de molarités croissantes de sulfate d'ammonium (0 à 3,2 M final).

La Figure 6 illustre la précipitation sélective des ARNs contaminants d'un lysat alcalin en présence de molarités croissantes de chlorure de calcium (10 à 100 mM). La molarité finale en CaCl_2 est indiquée sous les lignes concernées. S = dépôt d'une fraction

de l'échantillon de matériel soluble obtenu après traitement par le CaCl_2 ; l. = dépôt d'une fraction de l'échantillon de matériel insoluble obtenu après traitement par le CaCl_2 ; oc = ADN plasmidique de forme circulaire (open circle) ; sc = ADN plasmidique de forme surenroulée (super coiled) ; a = ARNs.

- 5 Les exemples qui suivent n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

EXEMPLES

- 10 Les solutions définies ci-après ont été préparées à partir de solutions mères ou produits chimiques obtenus commercialement.

EXEMPLE 1 : Purification du plasmide pCH110N à partir de la souche *E. coli* MC1061 transformée.

15

1. Préparation et amplification des cellules recombinantes

- On a recours à la souche *E. coli* MC1061 (Wertman et al., 1986, *supra*) et au plasmide pCH110N. Il s'agit d'un plasmide de 8,5 kb dont le maintien dans *E. coli* est assuré par une origine de replication (ColE1) et un gène de résistance à l'ampicilline, tous deux issus de pBR322. Le gène d'intérêt est constitué par le gène reporter β -galactosidase d'*E. coli* dont l'expression peut être facilement détectée par coloration au X-Gal (4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). Il est muni dans sa partie 3' d'une séquence codant pour un signal de localisation nucléaire eucaryote. La localisation nucléaire de la β -galactosidase recombinante permet de s'affranchir des problèmes de bruits de fond engendrés par la réaction croisée avec la β -galactosidase endogène de la cellule hôte également détectable par le Xgal, et donc d'assurer une détection spécifique de l'activité enzymatique résultant du plasmide transfectée. L'expression du gène reporter est dirigée par le promoteur précoce de SV40.

30

Les cellules MC1061 sont rendues compétentes par traitement au chlorure de calcium et transformées par le plasmide pCH110N. Les bactéries recombinantes sont sélectionnées en milieu sélectif. On choisit un clone par examen des profils de restriction à partir duquel on constitue un stock glycérol primaire.

5 Après inoculation d'une préculture en fiole, celle-ci est utilisée pour ensemer un fermenteur. La fermentation a été conduite en continu (batch) dans 18 litres d'un milieu LB 2 fois concentré (LB2x) sans ajout de substrat carbonné, à 37°C et en présence d'ampicilline (100 µg/ml). La culture est recueillie après 2 heures en phase stationnaire. Dans ces conditions et pour une densité optique finale DO_{600} de 7,5, on obtient 180 g de biomasse
10 totale.

2. Récolte de la biomasse cellulaire humide

Le contenu du fermenteur est réparti dans des pots de centrifugation propres et
15 stériles (Nalgène, ref 3122-1000, 3122-1010, 3120-1000 ou 3120-1010) et les cellules transformées récupérées par centrifugation à faible vitesse (5000 rpm (tours par min) pendant 30 min) et à 4°C. On peut employer une centrifugeuse Sorvall RC3 munie d'un rotor H6000-A ayant une capacité de 6x1 litre et procéder à trois centrifugations successives dans les mêmes pots afin de récolter la totalité de la culture. Après élimination du milieu, le
20 poids des culots cellulaires est estimé par pesée et ceux-ci peuvent être congelés à -20°C avant d'être traités par le procédé détaillé ci-dessous. Les cellules ainsi récoltées constituent la biomasse cellulaire humide.

3. Préparation du lysat acidifié

25 Le culot congelé est fragmenté et on prélève à l'aide d'une spatule la quantité de biomasse que l'on désire traiter. Par la suite, les volumes des solutions utilisées sont donnés pour 27 g de biomasse humide. Les cellules sont reprises dans 320 ml de tampon de resuspension (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) préalablement équilibré à 4°C et
30 remises en suspension à l'aide d'un homogénéisateur par cisaillement (Ultra Turrax-25 muni

d'une sonde de diamètre 18 mm) avant d'être lysées en présence de 320 ml de tampon de lyse (1 % SDS, 0,2 M NaOH) équilibré à 20°C. On laisse la lyse se poursuivre 5 min à température ambiante en agitant doucement la préparation par inversion puis on ajoute 320 ml de solution acide (CH₃COOK 3 M pH 5,5) équilibrée à 4°C. Le lysat cellulaire acidifié
 5 est laissé 20 min à 0°C en procédant régulièrement à des agitations douces par inversion. Le pH final est de 5,1.

4. Elimination des insolubles et concentration du filtrat

10 Le floculat est tout d'abord éliminé grossièrement par centrifugation à faible vitesse (5000 rpm pendant 30 min à 4°C dans un rotor GSA, Sorvall). Le surnageant est soumis à deux filtrations successives sur frittés de porosité contrôlée (16 à 40 µm puis 10 à 16 µm; frittés N° 3 et 4 ; Schott AG) à l'aide d'une fiole à vide connectée à une trompe à eau ou une source de vide équivalente.

15 Le filtrat est soumis à une étape de concentration par ultrafiltration sur cartouche Easy Flow (Sartorius) munie d'une membrane de polysulfone d'un seuil de coupure de 100 kDa (Sartorius, 0,1 m² référence 14669-OS-1-V ou 0,2 m² référence 14669-OS-2-V selon le volume à traiter). La cartouche est reliée à une pompe péristatique et le débit de recirculation appliqué est d'environ 400 ml/min. L'ultrafiltration est effectuée jusqu'à ce que
 20 le volume final soit réduit d'un facteur 8 à 16. On travaille à température ambiante afin de réduire la durée de l'opération.

Les acides nucléiques contenus dans le filtrat sont précipités par ajout de 0,7 volume d'isopropanol maintenu à 20°C. Le mélange est homogénéisé par retournements successifs, incubé 5 min à température ambiante et le précipité collecté par centrifugation à 10 000 rpm
 25 pendant 30 min à 4°C (rotor GSA, Sorvall). Après élimination du surnageant, le culot d'acides nucléiques est lavé 2 fois de suite par 50 ml d'une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau (équilibrée à environ -20°C) et à nouveau récupéré par centrifugation à 10 000 rpm pendant 15 min à 4°C.

Extraction des endotoxines

Le culot est séché et dissous dans 18 ml d'une solution d'acétate de sodium (CH_3COONa 0,3 M dans du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) et conservé une trentaine de minutes à 0°C. On ajoute 2 ml d'une solution de Triton™ X-114 (Sigma ; référence X-114™) à 10 % (poids/volume) dans CH_3COONa 0,3 M à pH 5,5 (concentration finale en Triton 1%) et le mélange est homogénéisé par agitation manuelle. Après incubation 10 min sur glace puis 25 min à 52°C, la phase inférieure obtenue après centrifugation (rotor SLA 1500, Sorvall) à 10 000 rpm pendant 10 min à 35°C est prélevée et éliminée. On procède à deux extractions supplémentaires dans les mêmes conditions en présence de 2,2 ml et 2,4 ml de Triton™ X-114 respectivement. La phase supérieure est précipitée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -20°C. Après incubation au moins 45 min à -20°C, le précipitat est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm (rotor SLA 1500, Sorvall) pendant 30 min et à 4°C et soumis à 1 ou 2 lavages successifs par une solution d'éthanol à 80 % dans l'eau conservée à -20°C. Le culot de centrifugation peut être congelé avant de procéder à la prochaine étape.

Elimination des ARNs

Le culot de centrifugation est séché sous vide et repris dans 9,4 ml de Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8 à température ambiante. On ajoute du sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ solide de manière à avoir une concentration finale d'environ 2 M. Après mélange par inversion et incubation 20 min sur glace, on centrifuge 30 min à 7 000 rpm (rotor SLA 1500, Sorvall) et à 4°C. Une deuxième centrifugation dans des conditions identiques est effectuée sur le surnageant récupéré de la première afin de parfaire l'élimination des insolubles.

Chromatographie sur Séphacryl S500

Le surnageant de centrifugation est soigneusement prélevé et soumis à une

chromatographie de gel filtration sur matrice Séphacryl S500 (Pharmacia ; référence 17-0613-01). Dans les conditions précitées, on utilise une colonne ayant une capacité de 1 litre (longueur 622 mm, diamètre 44 mm) développée à 3,8 ml/min (15cm/h) mais, bien entendu l'homme du métier est capable d'adapter la capacité de la colonne en fonction du volume à

5 traiter.

La colonne est équilibrée dans 2 volumes de TEN avant d'appliquer un volume d'échantillon d'acides nucléiques représentant 4 à 5 % du volume de celle-ci. La collecte et la détection des fractions sont automatisées (collecteur de fractions LKB 2212 et détecteur LKB 2158 Uvicord SD muni d'un filtre à 254 nm). Les fractions de 3 min sont prélevées et

10 congelées avant d'être analysées. La Figure 1 illustre un chromatogramme obtenu à plus petite échelle mais représentatif du procédé. L'ADN plasmidique sort dans le volume d'exclusion alors que ARN et protéines sont retenus et n'apparaissent que plus tardivement. On notera la nette séparation, avec un retour pratiquement à la ligne de base, obtenue entre le pic d'ADN plasmidique élué en premier et le pic d'ARNs élué en second.

15

Conditionnement

Les fractions contenant l'ADN plasmidique sont regroupées et concentrées environ 8 x à l'aide d'une unité d'ultrafiltration de type Sartocon-Micro à membrane de polysulfone

20 ayant un seuil de coupure de 100 kDa (Sartorius, référence 15669-00-1). Alternativement, et lorsque une plus grande quantité d'échantillon doit être traitée, on peut employer une unité d'ultrafiltration EasyFlow à membrane d'acétate de cellulose (20 kDa de seuil de coupure, Sartorius, référence 14549-0S-1V).

Après concentration, l'échantillon d'ADN plasmidique purifié est précipité par ajout

25 d'une solution d'acétate de Na (3 M, pH 5,5) jusqu'à la concentration finale de 0,3 M et addition de 2,5 volumes d'éthanol pur (99,95 %) à -20°C. Après incubation à -20°C (30 min), l'ADN plasmidique est récupéré par centrifugation à 10 000 rpm pendant 30 min à 4°C (rotor SLA 1500, Sorvall). Le culot est lavé par l'éthanol à 80 % à environ -20°C, puis séché et repris dans le tampon de conditionnement adéquat (TE, 0,9 % NaCl, Hepes Ringer, Lactate Ringer, H₂O ; environ 20 ml par aliquote de 27 g de cellules traitées).

30

Après mesure de la densité optique à 260 nm, la concentration en ADN est calculée en prenant pour base une DO_{260} correspondant à 50 $\mu\text{g/ml}$. Elle peut alors être ajustée à 1,0 mg/ml par dilution avec le tampon de conditionnement, et on obtient typiquement environ 20 mg d'ADN plasmidique par aliquote de 27 g de biomasse initiale.

5

EXEMPLE 2 : Purification du plasmide pTG11025 à partir de la souche *E. coli* DH10B transformée.

10 La souche *E. Coli* DH10B Electro Max est fournie par Gibco BRL (Référence 18290-015). Le plasmide pTG11025 (Figure 2) de 18,7 kb porte un gène marqueur qui confère aux bactéries la capacité de résistance à la kanamycine (gène codant pour une aminoglycoside 3' phosphotransférase transformant l'antibiotique en dérivé inactif) et l'origine de réplication ColE1, ces deux éléments assurant le maintien du plasmide dans la
15 souche productrice. Il comporte en outre une cassette d'expression de l'ADNc codant pour la dystrophine sous le contrôle du promoteur CMV associé à l'intron HMG.

Les cellules DH10B compétentes sont transformées par le plasmide dans les conditions préconisées par le fournisseur et on constitue un stock glycérol primaire conservé à -80°C après sélection d'un clone recombinant. Un lot de semence primaire est utilisé pour
20 constituer une préculture en fiole sur milieu LB2x en présence de kanamycine 50 $\mu\text{g/ml}$. La culture est incubée à 30°C dans un agitateur thermostaté (180 rpm) pendant 14 à 16 heures.

Après transfert de la préculture en fiole d'ensemencement, la souche transformée est propagée dans un fermenteur de 20 litres. La croissance est effectuée à 30°C dans un milieu de culture complexe (Hycase SF 37,5g/l, Yeast Extract 9g/l supplémenté en facteurs de
25 croissance et sels minéraux) utilisant le glycérol à titre de substrat carboné (20 g/l) et en présence de kanamycine (50 $\mu\text{g/ml}$) pour la pression de sélection. Le pH = 7,0 est régulé par addition automatique de soude (NaOH, 30%) et d'acide sulfurique (H_2SO_4 , 2 M). L'oxygène dissous est maintenu à une saturation supérieure ou égale à 25 % (taux d'aération de 1 v.v.m (10 l mn^{-1}) et une vitesse d'agitation variable. Il peut être avantageux d'ajouter de la
30 kanamycine en cours de culture.

La culture est stoppée par refroidissement à 4°C lorsque les bactéries atteignent la phase stationnaire de croissance. La culture est soutirée et la biomasse récoltée par centrifugation (centrifugeuse Sorvall RC3B, 15 min, 4°C, 5000 rpm). Le culot de cellules est conservé à -20°C jusqu'à la mise en application du procédé de purification du plasmide pTG11025.

Celui-ci est similaire au procédé décrit à l'exemple 1, à l'exception des modifications suivantes :

- La purification est effectuée à partir de 360 g de biomasse humide reprise dans 3840 ml de tampon de resuspension et lysée par un volume équivalent de tampon de lyse puis de solution acide.
- Les insolubles sont éliminés par filtration sur Fritté N° 4 (16-10 µm, Schott AG) avant concentration 15 fois sur Easy Flow.
- Le filtrat est séparé en 6 aliquotes. La précipitation à l'isopropanol, les lavages à l'éthanol 80 %, les étapes d'extractions des endotoxines par le Triton™ X-114, la précipitation à l'éthanol et les lavages à l'éthanol 80 % subséquents sont réalisés sur chacune des aliquotes comme décrit à l'exemple 1.
- Les échantillons sont regroupés pour la précipitation au sulfate d'ammonium à une molarité finale de 2 M.
- Le surnageant de centrifugation récolté après l'étape de précipitation au sulfate d'ammonium est chargé sur une colonne de gel filtration de Séphacryl S500 d'un volume de 5 litres (longueur 82 cm, diamètre 8,9 cm) développée à un débit de 15 ml/min (14,5 cm/h). Le chromatogramme obtenu (Figure 3) montre que l'ADN plasmidique est élué dans le volume d'exclusion, alors que les ARNs contaminants et autres composés de petits poids moléculaires sont retenus sur la colonne.
- Les fractions contenant l'ADN plasmidique purifié sont regroupées et concentrées par ultrafiltration (facteur 10,9). L'ADN plasmidique est alors précipité par ajout d'acétate de sodium à une concentration finale de 0,3 M et de 2,5 volumes d'éthanol 99,95 % à -20°C.
- Le précipité est collecté par centrifugation (10 000 rpm à 4°C, rotor SLA 1500

Sorvall, 30 min) et lavé par 200 ml d'éthanol à 80 %.

- Après séchage sous vide, l'ADN est repris dans le tampon de conditionnement TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), sa concentration mesurée par spectrométrie UV et ajustée à 1 mg/ml dans le même tampon. On obtient typiquement 145 mg d'ADN plasmidique purifié.

L'intégrité du plasmide est évaluée par cartographie par enzymes de restriction et les profils obtenus correspondent à ce qui est attendu. Par ailleurs, la présence de contaminants est également déterminée dans la préparation finale et les résultats présentés ci-dessous.

Contaminant	Méthode	Résultat
Protéines	BCA	0,49 % (n=3)
RNA	Réaction colorimétrique de Bial	2,48 % (n=3)
Endotoxine	Méthode colorimétrique LAL	2,34 UE/mg (n=5)

Par ailleurs, la fonctionnalité du plasmide pTG11025 purifié est vérifiée par transfection de lignées cellulaires et mise en évidence de la dystrophine recombinante par immunofluorescence.

Dix µg d'ADN plasmidique purifiés sont combinés à 40 µg de Lipofectine (un mélange de composés facilitant la transfection de cellules eucaryotes) suivant les instructions du fournisseur (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 18292-0011), puis sont ajoutés, dans 2 ml de milieu DMEM (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 11963), à $2,5 \times 10^6$ cellules A549 (adénocarcinome pulmonaire humain)ensemencées la veille dans une boîte de diamètre 35 mm, cultivées 24 heures en présence de milieu DMEM supplémenté par 10 % (vol/vol) de sérum de veau foetal (Life Technologies, Bethesda, USA, référence 10101-061) et préalablement rincées par un tampon physiologique (PBS

lx). Quatre heures après ajout de l'ADN, le milieu est complétement par 10 % (vol/vol) de
sérum de veau foetal, puis la culture est poursuivie 48 heures. Les cellules sont ensuite
fixées par traitement à -20°C dans un mélange méthanol/acétone (1/1) (vol/vol), séchées à
l'air, et incubées en présence d'abord d'un anticorps monoclonal de souris antidystrophine
5 (Novocastra, Newcastle/Tyme, UK, référence NCL-DYS2) puis d'un anticorps de lapin anti-
souris (ICN, Costa Mesa, USA, référence 651713) couplé au FITC (fluoresceïne thio-
isocyanate) ; les conditions détaillées de ces opérations sont connues de l'homme de l'art. La
dystrophine produite lors de l'expression du gène codé par le vecteur pTG11025 est détectée
par examen en microscopie de fluorescence des complexes immuns. L'examen simultané de
10 cellules transfectées en présence d'un plasmide pTG11025 contrôle de fonctionnalité déjà
démontrée purifié selon un protocole standard (Maniatis et al., 1989, *supra*) (témoin positif)
ou en absence d'ADN (témoin négatif) permet d'évaluer le caractère fonctionnel de la
préparation d'ADN plasmidique pTG11025. Le taux de cellules fluorescentes exprimant la
dystrophine recombinante est comparable après transfection par le pTG11025 contrôle et
15 par le plasmide purifié par le procédé selon l'invention. Bien entendu, les cellules non
transfectées ne montrent aucune fluorescence.

EXEMPLE 3 : Elimination des endotoxines par le Triton™ X-114.

20

Des essais d'extractions au Triton™ X-114 ont été menés sur un lysat alcalin tel
qu'obtenu à l'exemple 1 afin de déterminer les concentrations optimales de Triton™ X-114
à mettre en oeuvre et le nombre d'extractions à réaliser pour réduire le taux d'endotoxines
en dessous du seuil toléré (≤ 2 UE / dose).

25

Pour ce faire, le lysat alcalin initial est réparti en 2 lots soumis à 3 extractions
consécutives en présence de Triton™ X-114 à une concentration finale de 1 et 3 %
respectivement. Le mélange est homogénéisé, incubé sur glace (0°C) quelques minutes,
centrifugé 5 minutes (12000 rpm, centrifugeuse Eppendorf, référence 5414) à température
30 ambiante. Après centrifugation, la phase inférieure (Triton™ X-114 et endotoxines extraites)

de chaque lot est éliminée, et la phase aqueuse supérieure (Extr. 1 ; acides nucléiques et endotoxines restantes) traitée à nouveau comme décrit par 1 % ou 3 % de Triton™ X-114 après prélèvement d'une aliquote servant au dosage des endotoxines (Extr.2 et 3). Après la troisième extraction, la phase supérieure est précipitée par ajout de 2,5 volumes d'éthanol absolu. Le précipitat est repris dans du Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 8 (Final).

Le taux d'endotoxines est dosé par un essai colorimétrique dérivé de la méthode LAL, à l'aide du kit Biogenic COATEST (référence 822387) et les résultats présentés dans la Figure 4. On observe une réduction notable du taux d'endotoxines après deux extractions en présence de Triton 1 %. Un résultat similaire est obtenu lorsque 3 % de Triton™ X-114 sont utilisés. Dans les 2 cas, le taux d'endotoxines mesuré dans le produit final est compatible avec une utilisation pharmaceutique pour une dose moyenne de 1 mg d'ADN plasmidique.

15 EXEMPLE 4 : Précipitation selective des ARNs contaminants.

Des essais de précipitation selective ont été menés sur un lysat alcalin tel qu'obtenu à l'exemple 1 afin de déterminer les concentrations optimales en sulfate d'ammonium pour précipiter les ARNs contaminants. Pour ce faire, le lysat alcalin est réparti en 7 aliquotes
20 soumises à une précipitation en présence de quantité croissante de sulfate d'ammonium (0,5 M, 1 M, 1,5 M, 2 M, 2,5 M, 3 M et 3,2 M final).

Le matériel précipité récupéré par centrifugation et le matériel soluble sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 0,4 %. Après coloration au bromure d'éthidium et révélation par fluorescence UV, l'ADN plasmidique apparaît sous forme de bandes nettes
25 correspondant aux différents topoisomères. Au contraire, les ARNs forment une bande très diffuse migrant dans la partie inférieure du gel.

Les résultats illustrés dans la Figure 5 montrent qu'au-delà d'une concentration finale de 1,5 M en sulfate d'ammonium, la très grande majorité des ARNs se trouve sélectivement
30 précipitée alors que l'ADN plasmidique reste soluble. On notera également l'élimination dans le précipité d'espèces d'acides nucléiques de grande taille retenues dans les poches du gel

d'analyse.

EXEMPLE 5 : Précipitation sélective des ARNs contaminants au chlorure de calcium.

5

La précipitation sélective des ARNs a également été testée en présence de chlorure de calcium (CaCl_2). Un lysat alcalin préparé selon la méthode décrite dans l'exemple 1, incluant l'étape de traitement au Triton™ X-114, a été aliquoté en échantillons identiques auxquels différents volumes d'une solution de CaCl_2 concentrée (1M dans ce cas précis, 10
15 mais une solution moins concentrée, 0.5M par exemple, peut être utilisée) sont ajoutés afin d'obtenir une concentration finale en chlorure de calcium de 10, 20, 30, 50, 75 ou 100 mM, respectivement. Les fractions solubles et insolubles sont séparées par centrifugation, et le culot d'insoluble est resuspendu dans un tampon de faible force ionique en absence de CaCl_2 . Les échantillons solubles et insolubles sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au bromure d'éthidium d'une fraction d'échantillon afin de séparer
15 l'ADN plasmidique (formes circulaire ouverte et surenroulée) et les ARNs contaminants.

Les résultats (Figure 6) montrent qu'au-delà d'une concentration de 30 mM en CaCl_2 une précipitation détectable des ARNs est observée. Cette précipitation devient
20 importante puis massive au delà de 50 et 75 mM respectivement, puis quasi totale à 100 mM. L'ADN plasmidique sous ses formes circulaire ouverte (Open-Circle, migrant le moins rapidement) et surenroulée (Super-Coiled, migrant le plus rapidement) demeure pour sa part majoritairement soluble dans chacun des cas.

25

EXEMPLE 6 : Elimination des pigments colorés.

L'efficacité d'élimination des pigments colorés présents après l'étape de lyse alcaline (cf. Exemples 1, 2 et 5) a été évaluée au cours des étapes de concentration par
30 ultrafiltration, de précipitation par l'isopropanol et de lavage par l'éthanol à 80 %.

La présence de ces pigments se traduit par une coloration jaune du lysat alcalin brut avant sa concentration par ultrafiltration qui peut être analysée par mesure de la densité optique à 340 nm. Cette absorbance a donc été mesurée sur les échantillons obtenus après les étapes d'ultrafiltration initiale, de précipitation et de lavage par l'isopropanol et par l'éthanol à 80%. Deux séries d'expériences ont été réalisées, l'une mettant en jeu la filtration du lysat alcalin sur fritté de verre, l'autre sur cartouche de polypropylène Sartopure PP. Les lysats initiaux sont obtenus à partir de 150 g d'une biomasse cellulaire issue de deux fermentations du couple *E. coli* souche DH5 x plasmide pTG11025 (~19 kbp).

10

Expérience N°1 : Macrofiltration réalisée sur fritté de verre N° 3 (16 à 40 μ m de porosité - Schott AG

15

Etape	Volume final (ml)	Densité Optique à 340 nm	Rendement cumulé en pigments	Facteur d'élimination cumulé (X)
Lysat brut initial	5340 ml	0,29	100 %	1 X
Post macrofiltration	5260 ml	0,28	95,1 %	1,1 X
Post concentration par ultrafiltration (Easy- Flow 300kDa, Sartorius)	795 ml	0.38	19,5 %	5,1 X
Post précipitation alcoolique	432 ml	0.39	10,1 %	9,2 X

Expérience N°2 : Macrofiltration réalisée sur cartouche SartopurePP2 (8 mm de porosité - Sartorius)

Etape	Volume final (ml)	Densité Optique à 340 nm	Rendement cumulé en pigments	Facteur d'élimination cumulé (X)
Lysat brut initial	5200 ml	0.32	100 %	1 X
Post macrofiltration	5000 ml	0.31	93,1 %	1,1 X
Post concentration par ultrafiltration (Easy-Flow 300kDa, Sartorius)	790 ml	0.57	27,0 %	3,7 X
Post précipitation alcoolique	432 ml	0.62	16,1 %	6,2 X

5

Ces résultats montrent que les étapes d'ultrafiltration et de précipitation à l'isopropanol contribuent à l'élimination des pigments d'un facteur 4 à 5 x et 1,5 à 2 x, respectivement. Combinées, ces deux étapes permettent d'atteindre un facteur d'élimination de 6 à 10 X, soit une élimination totale de 80 à 90% des pigments colorés.

10

EXEMPLE 7 : Purification du plasmide pTG11025 à partir de la souche *E. coli* DH5 Library Efficiency.

La souche *E. coli* DH5 Library Efficiency (Life Technologies ; réf. 18262-014) est transformée avec le plasmide pTG11025 (voir exemple 2 et figure 2). Les étapes de

15

transformation, de préparation et de récolte de la biomasse sont identiques à celles décrites dans l'exemple 2.

Le lysat brut est filtré sur une cartouche de filtration Sartopure PP2 (Sartorius, réf. 5591302P9--0) sous un débit de 700 ml/min à l'aide d'une pompe péristaltique. Le filtrat
5 est ensuite concentré par ultrafiltration sur une membrane Millipore Minipellicon II en cellulose régénérée de type PL300 de surface $0,1 \text{ m}^2$ (réf. P2C300C01) (débit de recirculation $\sim 400 \text{ ml/min.}$, débit de soutirage compris entre 60 et 30 ml/min. de façon à maintenir une pression transmembranaire moyenne inférieure ou égale à $0,5 \cdot 10^5 \text{ Pa}$).

Les acides nucléiques ainsi concentrés (815 ml) sont traités à l'isopropanol et à
10 l'éthanol comme précédemment décrit dans l'exemple 2. Les endotoxines sont éliminées par trois extractions successives au Triton™ X-114. Les acides nucléiques sont précipités. Les sels et le détergent non ionique résiduels sont rinçés à l'aide d'éthanol aqueux.

Les acides nucléiques sont repris dans un tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 et les ARNs sont spécifiquement précipités en présence de CaCl_2 100 mM final. Ces ARNs
15 sont éliminés par centrifugation (10000 r.p.m., rotor Sorvall, SLA1500, température 20°C , 40 min.). L'ADN plasmidique présent dans la phase soluble est précipité par addition d'isopropanol et resolubilisé dans un tampon Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 250 mM, pH 8.

Un aliquote de l'échantillon correspondant à 180 g de la biomasse initiale est déposé
20 sur une colonne de Séphacryl S500 (volume de 6 l, longueur 92 cm, diamètre 8,9 cm, débit de 5 ml/min soit $\sim 5 \text{ cm/heure}$). L'absorbance de l'éluat est suivie à 254 nm. Les fractions contenant l'ADN plasmidique sont récoltées juste après élution du volume mort de la colonne ($\sim 2100 \text{ ml}$), alors que celles contenant les ARNs sont récoltées après environ 2 volumes morts ($\sim 4100 \text{ ml}$).

25 Les fractions contenant l'ADN sont ensuite regroupées (volume 1480 ml). L'ADN plasmidique est concentré par ultrafiltration sur une unité EasyFlow à membrane en triacétate de cellulose de seuil de coupure 20 kDa (Sartorius, réf. 14549-OS-1V). Après précipitation par l'éthanol en présence d'acétate de sodium, l'ADN plasmidique est lavé par l'éthanol 80% et séché sous vide puis repris dans un tampon de conditionnement Tris
30 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5 et stocké congelé à -20°C .

Afin d'analyser la qualité de cet ADN, les paramètres suivants ont été mesurés :

	Biomasse initiale :	360 g (poids humide) de pTG11025 / DH5LE approximativement 1,1 mg d'ADN / DO ₆₀₀ .ml).
5	Quantité finale :	120 mg (post Ultrafiltration finale)
	Conditionnement :	1 mg/ml dans Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5
	Protéines contaminantes:	< 0.20 % (n=1) (*)
	ARNs contaminants :	< 1.0 % (n=1) (*)
	Endotoxines :	3,7 UE/mg d'ADN
10	Fonctionnalité :	Actif en transfection <i>in vitro</i>
	Structure :	Conforme par analyse de restriction
	Rendement :	~ 30 %
		(*) valeurs < aux limites de quantification des dosages.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour préparer un ADN plasmidique à partir d'une biomasse cellulaire humide récoltée après fermentation d'une cellule productrice comprenant ledit ADN plasmidique, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
 - a) lyse alcaline de la biomasse resuspendue, après resuspension de la biomasse cellulaire humide,
 - b) acidification à force ionique élevée,
 - c) élimination des insolubles,
 - d) réduction des endotoxines et des acides ribonucléiques (ARN),
 - e) chromatographie de gel filtration, et
 - f) conditionnement.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'étape de lyse alcaline est effectuée en présence de soude et de sodium dodécyl sulfate (SDS).
3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape d'acidification est effectuée en présence d'acétate de potassium à un pH final d'environ 5,1.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape d'élimination des insolubles comprend au moins une étape de macrofiltration.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend deux à trois étapes successives de macrofiltration sur filtres de porosités décroissantes inférieures à 100 μm , 40 μm et/ou 16 μm .
6. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il comprend une seule étape de macrofiltration réalisée sur cartouche de porosité égale à 8 μm ou à 3 μm .

7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines comprend au moins une étape d'extraction en présence d'un détergent ayant un point nuage compris entre 15°C et 35°C, avantageusement 18°C et 30°C et, de préférence 20°C et 25°C.
- 5
8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines comprend 1 à 3 extractions successives réalisées en présence de 1 à 3 % final dudit détergent.
- 10
9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que le détergent est choisi parmi les polyoxyéthylènes.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le détergent est le Triton™ X-114.
- 15
11. Procédé selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'étape de réduction des endotoxines est suivie d'une étape de précipitation alcoolique.
12. Procédé selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'étape de réduction des ARNs comprend une précipitation sélective des ARNs dans des conditions de haute force ionique.
- 20
13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la précipitation sélective est effectuée en présence de sulfate d'ammonium à une concentration finale comprise entre 2 et 2,5 M.
- 25
14. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que la précipitation sélective est effectuée en présence de chlorure de calcium à une concentration finale comprise en 10 mM et 2M, avantageusement entre 20 mM et 0,5 M, et de manière préférée entre 50 mM et 0,1 M.
- 30

15. Procédé selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que l'étape de chromatographie de gel filtration est effectuée sur un support ayant une limite d'exclusion supérieure ou égale à 20×10^6 Da.
- 5
16. Procédé selon la revendication 15, caractérisé en ce que le support est sélectionné parmi les supports Séphacryl S500, Séphacryl S1000 et GF2000.
17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le conditionnement
- 10 comprend une étape de filtration stérilisante.
18. Procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend en outre entre les étapes c) et d), d) et e) et/ou e) et f), une étape de concentration suivie, de manière optionnelle, par une étape de précipitation alcoolique et resuspension en phase
- 15 aqueuse.
19. Procédé selon la revendication 18, caractérisé en ce que l'étape de concentration est effectuée par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa.
- 20
20. Procédé selon la revendication 19, caractérisé en ce que l'étape de concentration est effectuée par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 30 et 100 kDa.
- 25
21. Procédé selon l'une des revendications 1 à 20, caractérisé en ce que l'ADN plasmidique compris dans ladite cellule productrice est un ADN plasmidique recombinant comprenant un gène sélectionné parmi les gènes codant pour une cytokine, un récepteur cellulaire ou nucléaire, un ligand, un facteur de coagulation, la protéine CFTR, l'insuline, la dystrophine, une hormone de croissance, une enzyme, un inhibiteur d'enzyme, un
- 30 polypeptide à effet antitumoral, un polypeptide capable d'inhiber une infection

bactérienne, parasitaire ou virale et, notamment à VIH, un anticorps, une toxine, une immunotoxine et un marqueur.

5 22. Procédé selon l'une des revendications 1 à 21 pour la préparation d'un ADN plasmidique de taille supérieure à 10 kb.

10 23. Procédé selon l'une des revendications 1 à 22, caractérisé en ce que la biomasse cellulaire humide est récoltée après fermentation d'une souche d'*Escherichia coli* comprenant un ADN plasmidique recombinant.

24. Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que la souche d'*Escherichia coli* est sélectionnée parmi les souches DH5, DH10B et MC1061.

15 25. Procédé selon l'une des revendications 1 à 24, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) resuspension de la biomasse cellulaire humide,
- b) lyse alcaline de la biomasse resuspendue obtenue à l'étape a) en présence de soude et de SDS,
- c) acidification du lysat alcalin obtenu à l'étape b) en présence d'acétate de potassium à un pH final d'environ 5,1,
- 20 d) élimination des insolubles par macrofiltration du lysat acidifié obtenu à l'étape c),
- e) concentration du filtrat obtenu à l'étape d) par ultrafiltration sur membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa, et précipitation alcoolique suivie d'une resuspension du précipité en milieu aqueux,
- 25 f) réduction des endotoxines du précipité resuspendu à l'étape e) par extraction en présence de Triton™ X-114 suivi d'une précipitation alcoolique et d'une resuspension du précipité en milieu aqueux,
- g) réduction des ARNs du précipité resuspendu obtenu à l'étape f) par précipitation sélective en présence de sulfate d'ammonium ou de chlorure de calcium,
- 30 h) chromatographie de gel filtration du surnageant obtenu à l'étape g) sur un support

Séphacryl S500,

- 5 i) concentration des fractions contenant ledit ADN plasmidique obtenues à l'étape h) par ultrafiltration sur une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 20 et 300 kDa, de préférence entre 30 et 100 kDa, et précipitation alcoolique, et
- 5 j) conditionnement par resuspension du précipité obtenu à l'étape i) dans un tampon acceptable d'un point de vue pharmaceutique suivie d'une filtration stérilisante et d'une répartition en doses.

10 26. Composition pharmaceutique comprenant un ADN plasmidique purifié par le procédé selon l'une des revendication 1 à 25.

27. Composition pharmaceutique selon la revendication 26, comprenant en outre un composé lipidique.

15 28. Composition pharmaceutique selon la revendication 27, caractérisée en ce que le composé lipidique est choisi parmi le 5-carboxyspermylglycine dioctadecylamide (DOGS), le 3β ([N-(N',N'-diméthylaminoéthane)-carbamoyle] cholestérol (DC-Chol), le (2,3-dioleoyl-N-[2(sperminecarboxamido) éthyl] N, N-diméthyl-1-propanaminium trifluoroacétate) (DOSPA), la spermine cholestérol et la spermidine cholestérol.

20 29. Composition pharmaceutique selon l'une des revendications 26 à 28, comprenant en outre un adjuvant capable d'améliorer le pouvoir transfectant de ladite composition pharmaceutique.

25 30. Composition pharmaceutique selon la revendication 29, caractérisée en ce que ledit adjuvant est un lipide neutre et, notamment la dioleyle phosphatidyle éthanolamine (DOPE).

30 31. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 26 à 30, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement du corps humain ou animal par thérapie génique.

1 / 6

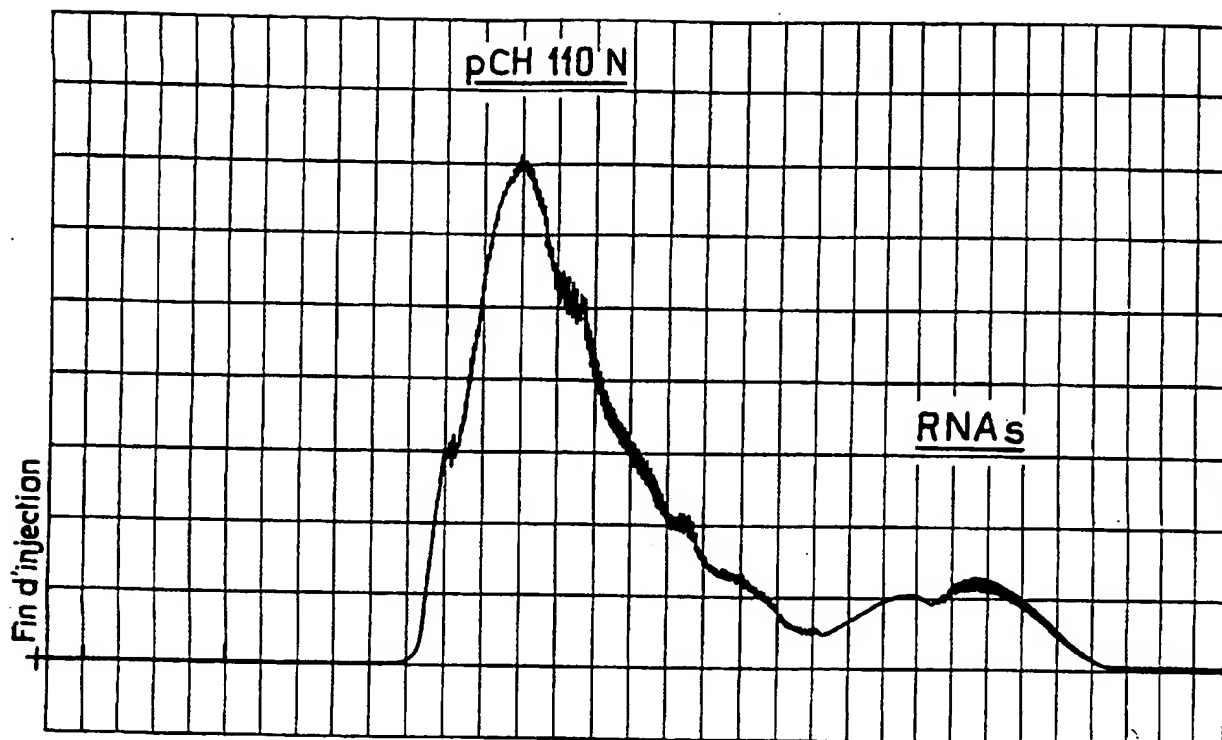


FIG. 1

2 / 6

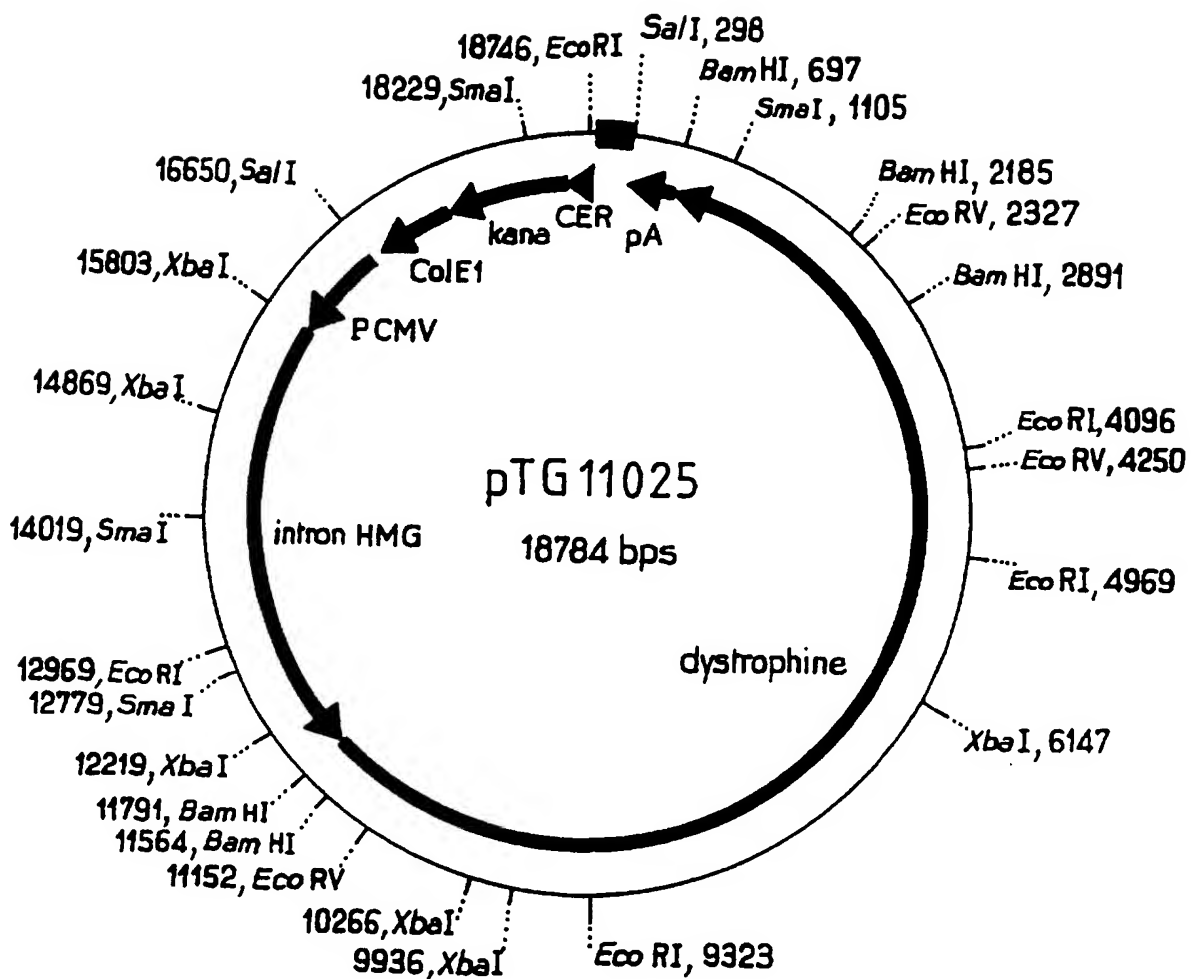


FIG. 2

3 / 6

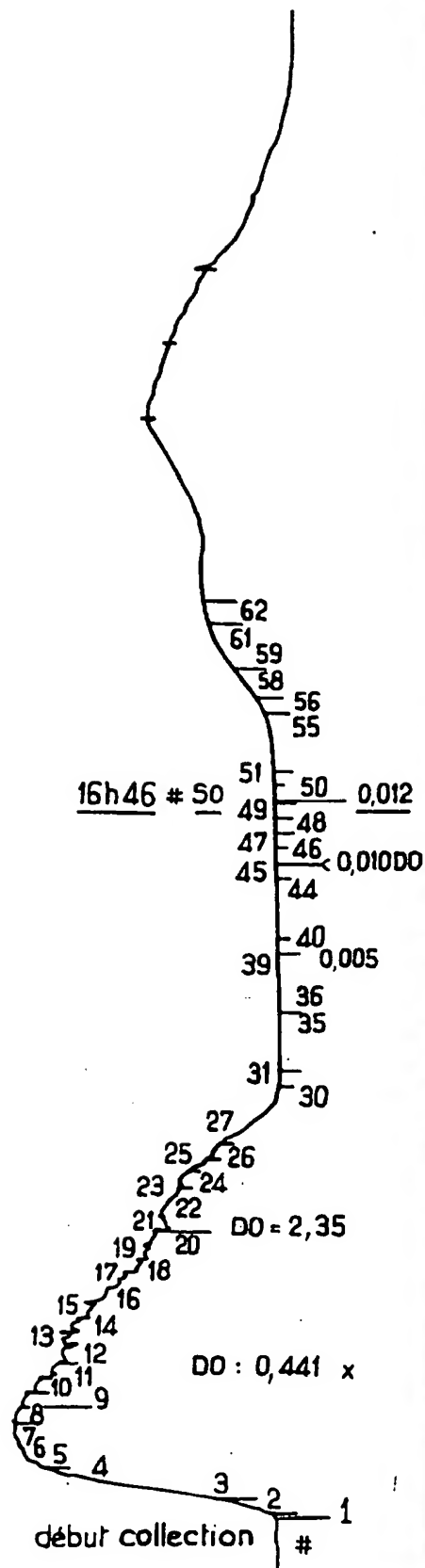
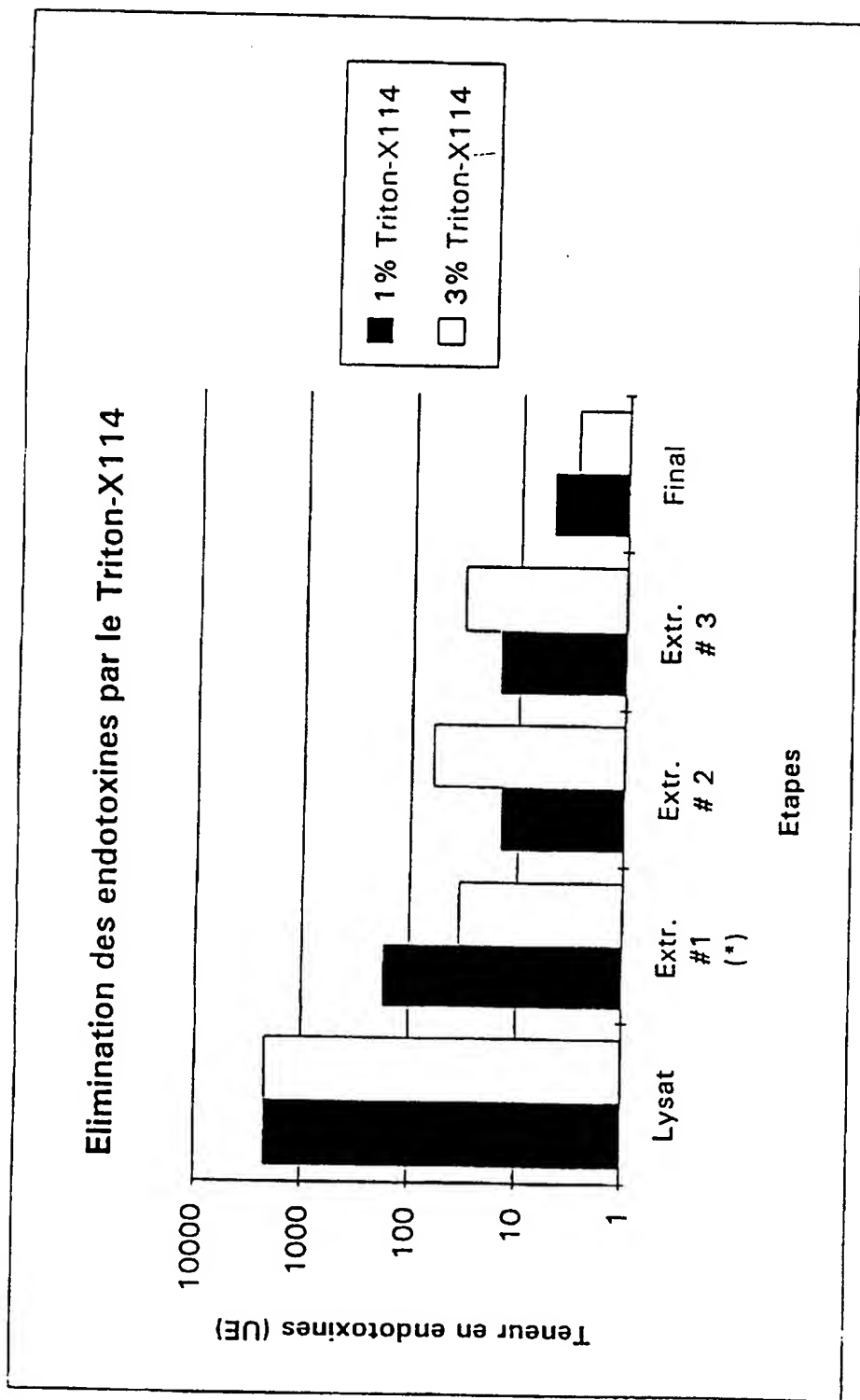


FIG.3



Légende :

- | | |
|------------|--|
| Lysat | Lysat alcalin initial |
| Extr. 1(*) | Après la 1ère extraction par le Triton X-114 |
| Extr. 2 | Après la 2ème extraction par le Triton X-114 |
| Extr. 3 | Après la 3ème extraction par le Triton X-114 |
| Final. | Produit final après précipitation alcoolique |

FIG. 4

5 / 6

Ligne	Echantillon
1	Lysat alcalin total : Surcharge 10 x
2	Lysat alcalin total
3	Précipitation par 0,5 M final de sulfate d'ammonium
4	Précipitation par 1,0 M de ""
5	Précipitation par 1,5 M de ""
6	Précipitation par 2,0 M de ""
7	Précipitation par 2,5 M de ""
8	Précipitation par 3,0 M de ""
9	Précipitation par 3,2 M de ""

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Gel N° 1 :

Matériel précipité
(ARNs)

Gel N° 2 :

Matériel soluble
(ADN plasmidique)

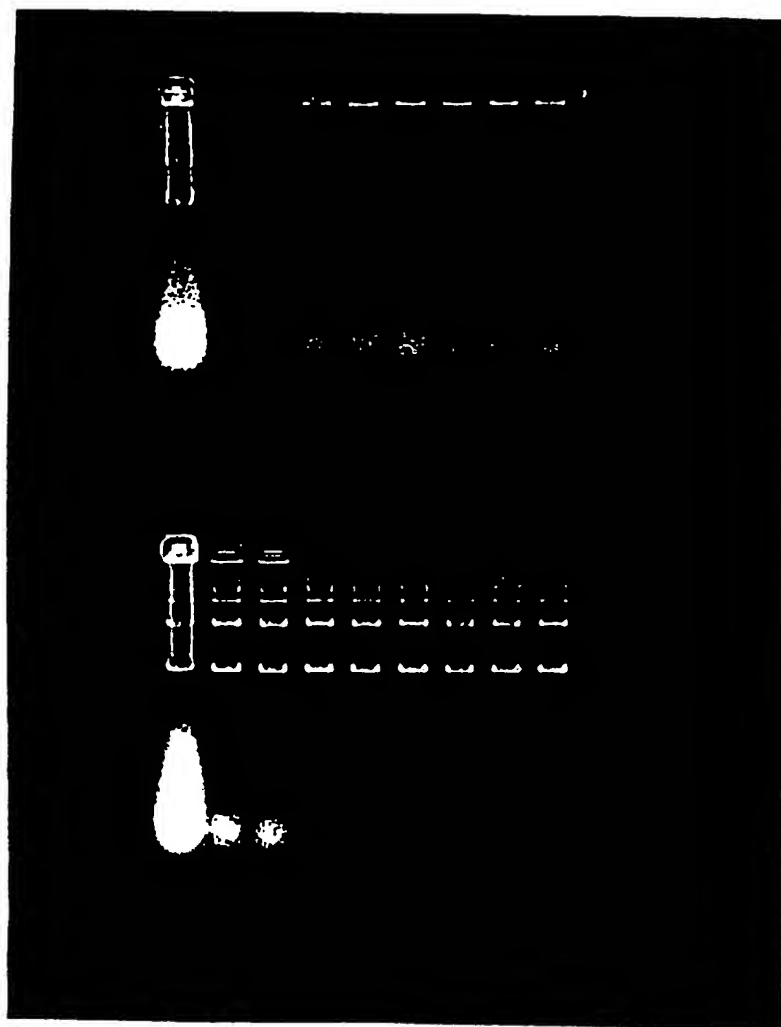


FIG. 5

6 / 6

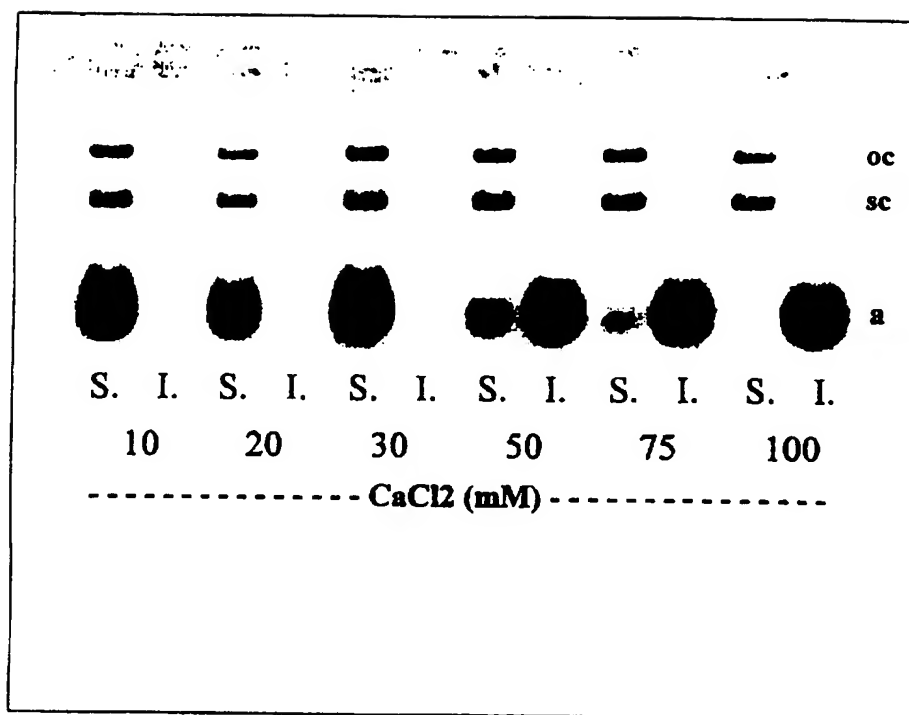


FIG.6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 97/01594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/10 C07K14/47 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HORN N A ET AL: "CANCER GENE THERAPY USING PLASMID DNA: PURIFICATION OF DNA FOR HUMAN CLINICAL TRIALS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 5, 1 May 1995, pages 565-573, XP000572705	1-5, 12, 14-18, 21, 23, 24, 26-31
Y	see the whole document	7-11, 25
Y	MONTBRIAND, P.M. & MALONE R.W.: "Improved method for the removal of endotoxin from DNA" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, January 1996, AMSTERDAM NL, pages 43-46, XP000673740 see page 43, column 1 - page 44, column 1, paragraph 2	7, 9-11, 25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"A" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 January 1998

Date of mailing of the international search report

10/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31.651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
P 97/01594

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category "	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AIDA, Y. & PABST, M. J.: "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 132, 1990, NEW YORK US, pages 191-195, XP002053532 see the whole document ---	8-10
A	WO 92 18514 A (MINNESOTA MINING & MFG) 29 October 1992 see the whole document ---	1,7
A	WO 95 21250 A (VICAL INC) 10 August 1995 cited in the application see the whole document ---	1
A	EP 0 248 690 A (CLONATEC SA) 9 December 1987 see column 3, line 23 - line 49 ---	6
P,A	WO 96 36706 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 21 November 1996 see the whole document -----	7,9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

EP 97/01594

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9218514 A	29-10-92	AU 1978692 A	17-11-92
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A	01-10-96
		CA 2179603 A	10-08-95
		EP 0742820 A	20-11-96
		JP 9509313 T	22-09-97
EP 0248690 A	09-12-87	FR 2598435 A	13-11-87
		DK 232187 A	07-11-87
		JP 63068100 A	26-03-88
WO 9636706 A	21-11-96	AU 5921996 A	29-11-96

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Je Internationale No

/FR 97/01594

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/10 C07K14/47 A61K48/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	HORN N A ET AL: "CANCER GENE THERAPY USING PLASMID DNA: PURIFICATION OF DNA FOR HUMAN CLINICAL TRIALS" HUMAN GENE THERAPY, vol. 6, no. 5, 1 mai 1995, pages 565-573, XP000572705	1-5, 12, 14-18, 21, 23, 24, 26-31
Y	voir le document en entier	7-11, 25
Y	MONTBRIAND, P.M. & MALONE R.W.: "Improved method for the removal of endotoxin from DNA" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, vol. 44, janvier 1996, AMSTERDAM NL, pages 43-46, XP000673740 voir page 43, colonne 1 - page 44, colonne 1, alinéa 2	7, 9-11, 25

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (elle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

27 janvier 1998

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

10/02/1998

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. e Internationale No

PCT 97/01594

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	AIDA, Y. & PABST, M. J.: "Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 132, 1990, NEW YORK US, pages 191-195, XP002053532 voir le document en entier ---	8-10
A	WO 92 18514 A (MINNESOTA MINING & MFG) 29 octobre 1992 voir le document en entier ---	1,7
A	WO 95 21250 A (VICAL INC) 10 août 1995 cité dans la demande voir le document en entier ---	1
A	EP 0 248 690 A (CLONATEC SA) 9 décembre 1987 voir colonne 3, ligne 23 - ligne 49 ---	6
P,A	WO 96 36706 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 21 novembre 1996 voir le document en entier -----	7,9,10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem a Internationale No

ST/FR 97/01594

Document brevet cite au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9218514 A	29-10-92	AU 1978692 A	17-11-92
WO 9521250 A	10-08-95	US 5561064 A	01-10-96
		CA 2179603 A	10-08-95
		EP 0742820 A	20-11-96
		JP 9509313 T	22-09-97
EP 0248690 A	09-12-87	FR 2598435 A	13-11-87
		DK 232187 A	07-11-87
		JP 63068100 A	26-03-88
WO 9636706 A	21-11-96	AU 5921996 A	29-11-96

(12) PATENT
(19) AUSTRALIAN PATENT OFFICE

(11) Application No. AU 199742128 B2
(10) Patent No. 733057

(54) Title
Method for preparing a plasmid DNA

(51)⁶ International Patent Classification(s)
C12N 015/10 C07K 014/47
A61K 048/00

(21) Application No: 199742128 (22) Application Date: 1997 .09 .10

(87) WIPO No: W098/11208

(30) Priority Data

(31) Number (32) Date (33) Country
96/11075 1996 .09 .11 FR

(43) Publication Date : 1998 .04 .02
(43) Publication Journal Date : 1998 .05 .28
(44) Accepted Journal Date : 2001 .05 .03

(71) Applicant(s)
Transgene S.A.

(72) Inventor(s)
Bruno Cavallini

(74) Agent/Attorney
FREEHILLS CARTER SMITH BEADLE, Level 43, 101 Collins Street, MELBOURNE VIC 3000

(56) Related Art
HUMAN GENE THERAPY 6:565-573, 1995

OPI DATE 02/04/98 APPLN. ID 42128/97
AOJP DATE 28/05/98 PCT NUMBER PCT/FR97/01594



AU9742128

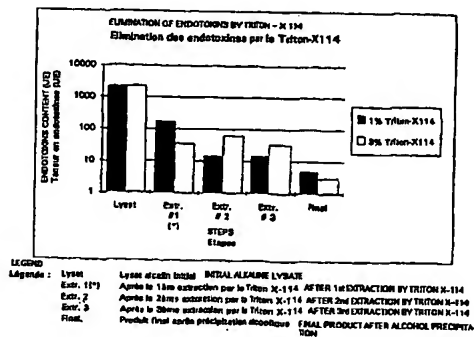
DEM.

(PCT)

(51) Classification internationale des brevets 6 : C12N 15/10, C07K 14/47, A61K 48/00		AI	(11) Numéro de publication internationale: WO 98/11208
			(43) Date de publication internationale: 19 mars 1998 (19.03.98)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/01594		(81) Etats désignés: AU, CA, JP, SG, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Date de dépôt international: 10 septembre 1997 (10.09.97)		Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont requises.	
(30) Données relatives à la priorité: 96/11075 11 septembre 1996 (11.09.96) FR			
(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR).			
(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CAVALLINI, Bruno [FR/FR]; 13, rue Saint-Cécile, F-67100 Strasbourg (FR).			
(74) Mandataires: MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).			

(54) Title: METHOD FOR PREPARING A PLASMID DNA

(54) Titre: PROCEDE DE PREPARATION D'ADN PLASMIDIQUE



(57) Abstract

The invention concerns a method for preparing a plasmid DNA using a wet cell biomass comprising after resuspension of said biomass the following steps: alkaline lysis, high ionic strength acidification, elimination of solubles, endotoxin and contaminating RNA reduction, filtering gel chromatography and conditioning. The invention also concerns a pharmaceutical composition containing a plasmid DNA and its use for gene therapy.

METHOD OF PREPARING PLASMID DNA

The subject of the present invention is a new protocol for purifying plasmid DNA which makes it possible to produce in a large quantity a DNA of acceptable pharmaceutical quality for use in humans. It also relates to a pharmaceutical composition comprising the DNA thus obtained and its use for the transfer of a nucleic acid into a host cell. The present invention is of particular interest for the purposes of gene therapy.

The transfer of genes into a given cell constitutes the very basis of gene therapy. This new technology, whose field of application is vast, makes it possible to envisage the treatment of serious diseases for which conventional therapeutic alternatives are not very effective or do not even exist and relates to both genetic diseases (hemophilia, cystic fibrosis, myopathy and the like) and acquired diseases (cancer, acquired immunodeficiency syndrome AIDS, and the like). The most widely used approach consists in using a viral vehicle to introduce the therapeutic nucleic acid into the cell to be treated and, in particular, a retroviral and adenoviral vehicle. Indeed, viruses have developed sophisticated mechanisms for crossing the cell membranes, for avoiding degradation at the level of the lysosomes and for causing their genome to penetrate into the nuclei in order to bring about the expression of the therapeutic gene. However, the viral approach has its limitations, in particular a limited cloning capacity, a potential production of replication-competent viral particles capable of spreading in the host organism and the environment, a risk of insertional mutagenesis in the case of retroviral vectors and, as regards adenoviral vectors, induction of immune and inflammatory responses in the host which hamper repetition of treatment. These major disadvantages in the context of a human use



justify the search for alternative systems for the transfer of nucleic acids.

5 An increasing number of methods for the transfer of genes make use of nonviral vectors. One of the most widely used consists in delivering the therapeutic nucleic acid by means of synthetic vectors such as cationic lipids which spontaneously interact with the nucleic acid to form positively charged complexes capable of fusing with the anionic cell
10 membranes and of bringing about the penetration of the nucleic acid which they are transporting (see for example Behr, Bionconjugate Chemistry (1994) 5: 382). A so-called biolistic method ("gene gun") using bombardment of cells with DNA-coated metallic microprojectiles
15 was recently used in the context of an anti-AIDS trial (Woffendin et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 2889-2894). Finally, an even simpler approach may also be envisaged by direct administration of naked DNA, especially in the context of diseases affecting the
20 muscles, by intramuscular injection. These nonviral methods generally use a plasmid vector carrying the therapeutic gene and the elements necessary for its expression.

The carrying out of clinical trials based on
25 nonviral methods requires being able to produce large quantities of plasmid DNA of pharmaceutical quality. The methods conventionally used are not optimal since they use enzymes of animal origin (lysozyme, proteinase, ribonuclease and the like), organic solvents known
30 for their toxicity (phenol, chloroform) and mutagenic compounds (ethidium bromide) which are likely to contaminate the final product. Furthermore, their use on an industrial scale is difficult to carry out.

International applications WO95/21250 and
35 WO96/02658 describe methods of preparing plasmid DNA in purified form, which methods can be used for human trials. However, it is known that a number of variables can influence the efficiency of preparative methods, especially the plasmid to be purified, its size, the



microorganism producing it, the fermentation medium and conditions. In this context, it is advantageous to be able to have a new method for the production of large quantities of plasmid DNA of pharmaceutical quality.

5 A new method of preparing plasmid DNA has now been found which comprises a succession of steps which are easy to carry out, avoiding the use of products of animal origin, toxic products and mutagenic products such as those cited above and which can be adapted to
10 an industrial scale. The DNA is produced with a high yield, in a substantially pure form and of a quality which is compatible with a human use. The residual contaminations with proteins, endotoxins, RNA and genomic DNA of the producing microorganism are particu-
15 larly low or even nondetectable by standard detection techniques. The examples which follow also show that this method allows the purification, in an efficient manner, of a large-sized plasmid incorporating the cDNA for dystrophin, intended for the treatment of
20 Duchenne's myopathy.

Accordingly, the subject of the present invention is a method for preparing a plasmid DNA from a wet cell biomass harvested after fermentation of a producing cell comprising said plasmid DNA,
25 characterized in that it comprises the following steps:

- a) alkaline lysis of the resuspended biomass, after resuspension of the wet cell biomass
- b) acidification at a high ionic strength,
- 30 c) removal of the insoluble matter,
- d) reduction of the endotoxins and of the ribonucleic acids (RNA),
- e) gel filtration chromatography, and
- 35 f) conditioning.

For the purposes of the present invention, "plasmid DNA" designates an extrachromosomal cellular element consisting of a generally circular DNA molecule capable of autonomous replication in a producing cell



(the cell in which it is amplified). The choice of plasmids which can be used in the method of the present invention is vast. They may be of any origin (prokaryotic or eukaryotic) or may be formed by the assembly of a variety of elements. In general, plasmids are known to persons skilled in the art. A large number of them are commercially available but it is also possible to construct them by genetic engineering techniques (Maniatis et al., 1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). There may be a cloning or expression vector derived for example from pBR322 (Gibco BRL), pUC (Gibco BRL), pBluescript (Stratagene), pREP4, pCEP4 (Invitrogen) or alternatively pPoly (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193-201).

Advantageously, a plasmid used in the context of the present invention possesses the genetic elements which allow it to replicate autonomously in the producing cell and, optionally, in a host cell (cell in which the therapeutic effect is sought). Such elements may consist, inter alia, of a replication origin allowing initiation of replication in a bacterium, a yeast, a fungus or a mammalian cell. It may be isolated from a prokaryot (ColE1 and the like), from a eukaryot (2 μ or ARS for autonomously replicating sequence), from a virus (SV40 ori from the simian virus 40, oriP from the Epstein-Barr virus EBV and the like) or from a bacteriophage (flori and the like). The choice of the appropriate replication origin is within the capability of persons skilled in the art. For example, for a plasmid intended to be produced in the microorganism *Escherichia coli* (*E. coli*), the ColE1 origin will be selected. Furthermore, if it is desired that it should be self-replicating in a mammalian host cell, it will also comprise an origin which is functional in a eukaryot, for example oriP, and it may also include the gene encoding the EBNA-1 protein of the EBV virus which is necessary for replication using it (Lupton and



Levine, 1985, Mol. Cell. Biol. 5,2533-2545; Yates et al., Nature 313, 812-815).

Moreover, a plasmid in use in the present invention may, in addition, comprise a selectable gene
5 which makes it possible to select or identify the cells transfected (producing cells and/or host cells). It is possible to apply the methods of selection based on the principle of deficient producing cells (through auxotrophic mutations or introduction of a lethal gene)
10 which are incapable of growing in the absence of a plasmid carrying a gene complementing this deficiency (for example dap system described in Patent EP 0,258,118, complementation of an auxotrophic mutation, use of genes encoding a suppressor tRNA supE,
15 supF and the like). Another practice which is commonly used consists in integrating into the plasmid a gene encoding resistance to an antibiotic (ampicillin, kanamycin, tetracycline and the like). Of course, it may comprise additional elements which enhance its
20 retention and/or its stability in a host or producing cell. In this regard, there may be mentioned the cer sequence whose presence promotes the monomeric retention of a plasmid (Summers and Sherrat, 1984, Cell 36, 1097-1103) and some sequences of viral origin
25 (retrovirus LTR, ITR from an adeno-associated virus and the like) or of cellular origin allowing integration into the chromosomes of the host cell.

In accordance with the aims pursued by the present invention, a plasmid in use in the present
30 invention is intended to transport one or more genes of therapeutic interest into a host cell. In general, the gene of interest may encode an antisense RNA, a messenger RNA which will then be translated into a polypeptide of interest, a ribozyme or alternatively an
35 RNA which confers a direct therapeutic benefit (VA RNA of an adenovirus capable of repressing the immune response, RNA which activates the synthesis of interferon) (Abbas et al., in Cellular and Molecular



Immunology; W.B., Saunders Company Harcourt Brace Jovanovich Inc. p. 228).

The gene of interest may be isolated by any conventional technique such as cloning, PCR (Polymerase Chain Reaction) or alternatively synthesized chemically. It may be of the genomic type (equipped with one or more introns) or complementary DNA (cDNA). The polypeptide of interest may consist of a mature protein, a precursor and in particular a precursor intended to be secreted and comprising a signal peptide, a truncated protein, a chimeric protein derived from the fusion of sequences of various origins or alternatively a mutated protein having improved and/or modified biological properties.

By way of examples, use may be made of a gene of interest selected from those encoding the following polypeptides:

- cytokines or lymphokines (α -, β - and γ -interferons, interleukins and especially IL-2, IL-6, IL-10 or IL-12, tumor necrosis factors (TNF), colony-stimulating factors (GM-CSF, C-CSF, M-CSF and the like);
- cellular or nuclear receptors, especially those recognized by pathogenic organisms (viruses, bacteria or parasites) and, preferably, by the HIV virus (Human Immunodeficiency Virus) or their ligands;
- proteins involved in a genetic disease (factor VII, factor VIII, factor IX, dystrophin or minidystrophin, insulin, CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) protein, growth hormones (hGH);
- enzymes (urease, renin, thrombin and the like);
- enzyme inhibitors (α 1-antitrypsin, antithrombin III, viral protease inhibitors and the like);
- polypeptides with antitumor effect which are capable of inhibiting, at least partially, the initiation or the progression of tumors or cancers



- (antisense RNA, antibodies, inhibitors acting on cell division or transduction signals, products of expression of tumor suppressor genes, for example p53 or Rb, proteins stimulating the immune system and the like);
- 5 - proteins of the major histocompatibility complex classes I or II or regulatory proteins acting on the expression of the corresponding genes;
 - polypeptides capable of inhibiting a viral, 10 bacterial or parasitic infection or its development (antigenic polypeptides having immunogenic properties, antigenic epitopes, antibodies, transdominant variants capable of inhibiting the action of a native protein by competition and the like);
 - 15 - toxins (thymidine kinase of the herpes simplex virus 1 (TK-HSV-1), ricin, cholera or diphtheria toxin and the like) or immunotoxins; and
 - markers (β -galactosidase, luciferase and the 20 like).

Of course, the gene of interest may be placed under the control of elements necessary for its expression in the host cell. "Elements necessary for 25 its expression" designate all the elements allowing its transcription into RNA and the translation of an mRNA into a polypeptide. Among these, the promoter is of particular importance. It may be derived from any gene (eukaryotic, viral, natural promoter of the gene of 30 interest in question and the like) or it may be artificial. Moreover, it may be constitutive or regulatable. Alternatively, it may be modified so as to enhance the promoter activity, suppress a region inhibiting transcription, modify its mode of regulation, introduce a restriction site and the like. There 35 may be mentioned, by way of examples, the CMV (Cytomegalovirus) viral promoter, RSV (Rous Sarcoma Virus) viral promoter, HSV-1 virus TK gene promoter, SV40 virus early promoter, MLP adenoviral promoter and



the like, or alternatively eukaryotic promoters of the murine or human PGK (phospho glycerate kinase) gene, α 1-antitrypsin gene (liver-specific), and immunoglobulin genes (lymphocyte-specific).

5 Such elements may also comprise additional elements such as introns, signal sequence, nuclear localization sequence, sequence for termination of transcription (polyA), site for initiation of translation of the IRES type or of another type, and the like.

10 A plasmid in use in the present invention is amplified in a producing cell before being purified according to the method of the present invention. Gram-negative bacteria and in particular *E. coli* are most particularly preferred. As a guide, there may be
15 mentioned the strains DH5 (Grant et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4645-4649), MC1061 (Wertman et al., 1986, Gene 49, 253-262) and its derivatives such as DH10B (Grant et al., 1990, *supra*). Given that this is a technology which is widely known to date, only a
20 brief description will be given of the procedure to be carried out in order to introduce a plasmid into a bacterium and to amplify it. All conventional techniques may be used in the context of the present invention (treatment with calcium, rubidium and
25 hexaminecobalt chlorides, with reducing agents, with DMSO, electroporation, transduction, liposomes and the like; Maniatis et al., 1989, *supra*). The producing cells thus transformed are then altered according to general practices in the art (continuous, "batch" or
30 "fed batch" fermentation. The culture conditions can be easily established by persons skilled in the art on the basis of the general knowledge in this field and of the selection system carried by the plasmid. Their harvest is carried out according to the usual techniques, such
35 as filtration or alternatively low-speed centrifugation, in order to generate the wet cell biomass which can, at this stage, be frozen or stored at 4°C before being subjected to the method according to the invention.



According to the method of the invention, the lysis of the wet cell biomass is carried out after having carried out its resuspension. A resuspension buffer is generally used which is slightly basic in order to neutralize the acidic character of the cellular paste and which is of a low ionic strength having little or no lytic effect on the transformed cells. Its composition and its pH can vary in particular according to the producing cell, the culture medium used or any other parameter. Persons skilled in the art are capable of preparing an appropriate resuspension buffer. There may be mentioned, by way of example, a buffer containing EDTA (concentration of 1 to 50 mM, preferably 10 mM) and Tris-HCl (concentration of 10 to 100 mM, preferably 50 mM) buffered to a pH of about 8. The cells can be resuspended by any usual technical means such as rectilinear stirring, repeated pipetting and/or homogenizer (vortex, homogenizer via shearing and the like).

The alkaline lysis step makes it possible to release the cellular content and to solubilize all the components thereof. Proteins, RNA and DNA are denatured including the plasmid DNA whose two homologous strands remain entangled, unlike the genomic DNA. It may be advantageous to carry out the alkaline lysis in the presence of a detergent and, preferably, of an anionic surfactant. The choice of the base and of the surfactant is not limited. In this regard, the combination sodium hydroxide and SDS (sodium dodecyl sulfate) is preferred, especially at final concentrations of about 0.1 M and 0.5% respectively. The final pH of the lysis solution is preferably between 11 and 13 and, optimally, between 12.2 and 12.4. It is indicated that it is preferable to mix the resuspended transformed cells and the lysis solution gently, for example by inverting, so as to minimize breaks in the genomic cellular DNA which would then be capable of contaminating the plasmid DNA preparation. Although this is not a preferred embodiment, it is nevertheless possible, in



the context of the present invention, to facilitate the cell lysis by heating at a high temperature (see for example international application WO96/02658) or the use of animal enzymes which degrade the cell membranes (lysozyme and the like).

The second step of the method according to the invention results in acidification, at high ionic strength, of the lysate obtained above. The acidification is preferably carried out suddenly, that is to say in a single step. Under these conditions, the plasmid DNA is rapidly renatured while the great majority of proteins, of denatured genomic DNA and of the RNA species which are insoluble under a high ionic strength condition circulate. In the context of the present invention, a solution comprising a buffer or a strong acid combined with a salt whose pH is between 4.5 and 6.5 is used. According to an advantageous embodiment, a solution of potassium acetate at a final concentration of close to 1 M is preferably used so as to obtain a final pH of about 5.1. However, it would also have been possible to use a solution of sodium acetate having a pH and a concentration as indicated above.

The insoluble matter consisting of cellular debris and flocculates of macromolecules are then removed. This may be carried out by any conventional filtration or centrifugation technique. It may be judicious to remove most of the insoluble matter first by centrifugation and then to continue the clarification by filtration. Many filters can be used in the context of the present invention provided that they retain the insoluble matter and allow the plasmid DNA to pass through. Advantageously, the filter chosen will have a porosity of between 1 and 100 μm , more advantageously 2 and 75 μm , preferably 5 and 75 μm , most advantageously 3 and 50 μm , and most preferably 10 and 50 μm . It may be made of a synthetic material such as nylon, an organic material such as cellulose or a nonorganic material such as glass. According to an advantageous embodiment, successive filtrations are



carried out with the aid of filters of decreasing porosities, for example a first filtration on sintered glass having a porosity of between 100 and 40 μm (No. 2 sintered glass, Schott AG), the second on sintered
5 glass having a porosity of 16 to 40 μm (No. 3 sintered glass, Schott AG) and the last on sintered glass having a porosity of 10 to 16 μm (No. 4 sintered glass, Schott AG).

According to another variant, it is possible to
10 carry out a single filtration using polypropylene cartridge Sartopure PP having a porosity of 8 μm (Ref. 552 1302 P9-00-A) or Sartopure PP2 having a porosity of 3 μm (Ref. 559 1302 P9-00-A).

According to an optional but particularly
15 advantageous embodiment, the filtrate may be concentrated before the next step of reduction of endotoxins. The means for concentrating a DNA dissolved in an aqueous solution are known to persons skilled in the art. There may be mentioned ultrafiltration, alcohol
20 precipitation or alternatively a combination of these two techniques.

As regards ultrafiltration, various membranes can be used as long as they do not or only slightly adsorb the plasmid DNA under the conditions for use.
25 Membranes may be advantageously used whose cut-off is between 20 and 300 kDa, preferably between 30 and 100 kDa. They may be of varied compositions, organic or otherwise (poly(ether)sulfone, cellulose acetate and the like). The membranes which are particularly
30 suitable are those of the YM type (and in particular YM30-76, Diaflo and YM30-4208, Centricon), those with which the Easy Flow units are equipped (reference 14669-OS-1V or 14669-OS-2V, Sartorius) or alternatively
35 minipellicon 2 PL300 (Millipore made of regenerated cellulose). Ultrafiltration constitutes, at this step, a powerful means of reducing the contamination of the plasmid DNA preparation with pigments of cellular origin or derived from the culture medium.



It is also possible to concentrate the nucleic acids by alcohol precipitation in the presence of ethanol or isopropanol. The precipitation parameters such as volume of alcohol to be added, temperature, 5 presence of monovalent cations as well as the recovery of the precipitated material are detailed in many manuals accessible to persons skilled in the art. In particular, precipitation with isopropanol has the advantage of further reducing the content of pigments, 10 some of them being soluble in the alcoholic phase.

According to a preferred mode, the filtrate is first concentrated by ultrafiltration on a polysulfone membrane having a cut-off of about 100 kDa with the aid of a disposable Easy Flow type unit (Sartorius) or on a 15 minipellicon 2 PL300 membrane (Millipore) having a cut-off of about 300 kDa. Once the volume is reduced by a factor of 5 to 20, the nucleic acids are precipitated by addition of 0.7 volume of isopropanol. The precipitated material is recovered by centrifugation and may 20 be subjected to one or more washes in ethanol at a concentration of 70 to 80% in order to reduce the alcohol-soluble contaminants as salts and, as already mentioned, residual pigments. After drying, the nucleic acids are taken up in an appropriate buffer, for 25 example 10 mM Tris-HCl, pH 8, containing EDTA at a concentration of about 1 mM, in order to inhibit the nucleases, and optionally sodium acetate (at a final concentration of about 0.3 M which allows the precipitation of the nucleic acids after the step of 30 extraction with Triton). It is important to note here that the ultrafiltration and isopropanol precipitation steps are particularly advantageous in order to remove most of the pigments from the preparation.

At this stage, the plasmid DNA preparation 35 contains large quantities of RNAs and of endotoxins and the following steps consist in a reduction of their levels. Reduction is understood to mean a substantial reduction in the level of endotoxins or RNA between the beginning and the end of the step, by a factor of at



least 100 and, preferably, of at least 1000. The concentration of RNA and endotoxins may be assessed by tests similar to those described below or by any other methodology disclosed in the literature. Although the steps can be interchanged, it is preferable, in the first place, to act on the endotoxins and then on the RNAs.

Endotoxins, because of their pyrogenic character, should be considerably reduced or even eliminated before envisaging administration to humans. As regards common pharmaceutical products, the maximum dose which can be tolerated has been set by the health authorities at 5 units (EU) per dose. Now, it has been shown that common methods of preparing plasmid DNA (ultracentrifugation on cesium chloride gradient, anion-exchange chromatography and the like) allow large quantities of endotoxins to remain (Cotten et al., 1994, Gene Therapy 1, 239-246).

For the purposes of the invention, use will be preferably made of an extraction in the presence of a nonionic detergent having a cloud point of between 15°C and 35°C, advantageously 18°C and 30°C and, preferably, 20°C and 25°C. A preferred detergent is chosen from the polyoxyethylenes. Examples of detergents which can be used according to the present invention are described in the following table:



Detergent	Cloud point (°C)	Density (20°C)	Formula	Supplier
Brij58	45°C	-	$C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_{20}OH$	ICI Americas
Triton™ X-114	22°C	1.054	$(CH_3)_3C-CH_2-C(CH_3)_2-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7-8}OH$	Sigma
Tergitol™ TMN6	37°C	1.009	$C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_8OH$	Sigma
Tergitol™ NP7	41°C	1.048	$C_9H_{19}-C_6H_4-(OCH_2CH_2)_{7-8}OH$	Sigma
Tergitol™ Min-Foam IX	40°C	0.995	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x [CH_2CH_2O/CH_2CH(CH_3)O]_yCH_2CH(CH_3)OH$	Sigma
Tergitol™ Min-Foam 2X	20°C	0.978	$C_{11-15}H_{23-31}-O(CH_2CH_2O)_x [CH_2CH_2O/CH_2CH(CH_3)O]_yCH_2CH(CH_3)OH$	Sigma

The compounds described above are amphiphilic compounds whose miscibility in the aqueous phase may be controlled by varying the temperature around their cloud point. Advantageously, according to the method of the invention, the DNA preparation is cooled to a temperature of less than 10°C before adding said detergent. The final concentration of detergent to be used may be between 0.5 and 6%, advantageously between 1 and 5% and, most preferably, at around 1%. Under these conditions, said detergent is soluble in water and forms micelles which complex the endotoxins. After incubation and centrifugation of the plasmid DNA/detergent mixture at a temperature considerably greater than the cloud point (for example >37°C in the case of Triton™ X-114), there is separation of two phases: an aqueous phase containing the plasmid DNA and a phase containing the detergent and the endotoxins. When the detergent chosen has a density greater than that of the DNA solution, after separation of the phases by centrifugation, the aqueous phase is located



in the top part of the tube and the phase containing the detergent and the endotoxins in the bottom part, and conversely when the detergent has a density less than that of the DNA solution. For obvious technical reasons, a detergent will be preferably chosen which has a density greater than that of the DNA solution. Persons skilled in the art have, in addition, the necessary knowledge allowing them to adjust, if necessary, the density of the DNA solution by modifying, for example, the salt concentration of said solution. The method according to the invention may comprise one or more (preferably 3) successive extractions as described above.

According to the present invention, a preferred detergent consists of Triton™ X-114 (octoxynol or octylphenoxy-poly(ethyleneglycoether)_n with n = 7 or 8) whose cloud point is about 20°C and the density about 1.06.

The present invention also relates to a variant of the method of the invention according to which the nonionic detergent chosen has a cloud point situated outside the recommended range, and according to which said cloud temperature is adjusted by the addition of a small quantity of an anionic detergent ("Nonionic Surfactants", Chapter "Surfactant and Detergent Systems" in Kirk-Othmer Encyclopaedia of Chemistry, John WILEY & Sons, 1995).

According to an advantageous variant of the method according to the invention, the reduction in the endotoxins is followed by a step of alcohol precipitation of the plasmid DNA by incubating at cold temperature (4°C, -20°C or -80°C) in the presence of 0.3 M sodium acetate and about 70% ethanol. The precipitate of nucleic acid is conventionally recovered by centrifugation. It may be washed with an 80% ethanol solution in water before being dried and redissolved in an aqueous medium such as for example 10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA. This precipitation step, which is



moreover optional, offers an effective means of removing traces of residual Triton™ X-114.

The reduction in the contamination by RNAs may be carried out by any means known in the art, for example enzymatic hydrolysis by means of a ribonuclease of animal origin such as bovine pancreatic ribonuclease A. However, in the context of the present invention, it is preferable to use a selective precipitation of the RNAs under conditions of high ionic strength and in the presence of dehydrating agents. Various salts may be used and there may be mentioned, as a guide, lithium chloride (Ze'ev Lev, 1987, Analytical Biochemistry 160, 332-336), calcium chloride, ammonium acetate and ammonium sulfate. In this regard, ammonium sulfate constitutes a preferred embodiment, particularly at a final concentration of between 1 and 3.5 M, preferably between 1.5 and 3 M and, most preferably, between 2 and 2.5 M. According to another variant of the invention, calcium chloride may be used at a final concentration of between 10 mM and 2 M, advantageously between 20 mM and 0.5 M, and preferably between 50 mM and 0.1 M. Optimally, after the addition of the salt or of the saline solution, the mixture is kept gently stirred, optionally at low temperature, for a variable period (1 to 120 min), centrifuged and the plasmid DNA recovered in the supernatant.

The method according to the invention comprises, at this stage, a step of exclusion chromatography on gel filtration supports, which makes it possible to complete the purification of the plasmid DNA preparation (reduction of the residual RNAs and proteins) and also to bring about desalting. The choice of supports is broad and within the capability of persons skilled in the art. Supports approved for human or veterinary use by the competent American authorities (FDA for Food and Drug Administration) and/or the European Union agencies and having a high exclusion limit, in particular greater than or equal to



20 x 10⁶ Da (as measured on polymers such as dextrans) will be more particularly selected. There may be mentioned, for example, the supports Sephacryl S500 HR (Pharmacia, reference 17-0613-01), S1000 SF (Pharmacia, reference 17-0476-01) and GF2000 (Biosepra, reference 260651). The Sephacryl S500 support is preferred in the context of the invention.

The column is initially equilibrated under saline conditions which limit the hydrophobic interactions between the support and the DNA. Advantageously, TEN buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA and 100 mM NaCl) is used. The chromatography conditions may be adjusted as a function of various parameters and in particular the column volume, the support chosen, the plasmid DNA concentration in the preparation and the size of the plasmid DNA. The plasmid DNA is excluded from the phase and is eluted before the low-molecular weight contaminants. The fractions containing it may be analyzed by the customary techniques (absorbent at 254 nm, visual analysis after separation by agarose gel electrophoresis and the like). It is also possible to connect the column to a detector provided with a filter (at 254 nm for example) for the on-line detection of positive fractions. It will be noted that one advantage of the method according to the invention consists in the removal, during this step, of the residual salt derived from the preceding step.

According to an optional embodiment, the fractions obtained after the chromatographic step may be combined and concentrated according to the methodology indicated above (ultrafiltration and/or alcohol precipitation).

Finally, the method according to the invention comprises a step for conditioning the plasmid DNA preparation. The conditioning buffers which can be used in the context of the present invention are varied. There may be a physiological saline solution (0.9% NaCl), a Hepes-Ringer, Lactate-Ringer or TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.5 to 8, 1 mM EDTA) solution or simply



H₂O. Optionally, the preparation may be subjected to a sterilizing filtration. Use will be advantageously made of 0.22 µm filters having a surface area which is suited to the volume to be treated. There may be mentioned, for example, the filtration units of the type including Minisart (Sartorius, reference SM16534), Sartolab P20 (Sartorius, reference 18053D), Millex GF (Millipore, reference SLGS025BS), Millex GV (Millipore, reference SLGV025BS), Millex GP (Millipore, reference SLGPR25LS), Anotop 25 (Whatman, reference 20025H-68092122), Anotop 25 Plus (Whatman, reference 2002AP-68094122), Sartobran 300 (reference 5231307H5p00V) or Easy Flow 0.2 µm made of cellulose acetate (reference 12307-05-1-V). Next, the filtrate is conditioned in doses adjusted to a given concentration.

The plasmid DNA concentration may be determined in a conventional manner, for example by spectrophotometry at a wavelength of 260 nm. The relative proportion of the different topoisomers may be visually evaluated by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide optionally followed by a densitometric analysis. The integrity of the plasmid may be checked by digestion with restriction enzymes having one or more cleavage sites.

The quality of the plasmid DNA prepared by the method according to the invention may be assessed by standard assays such as those which are described in the examples which follow. Contamination with RNA may be evaluated visually by agarose gel electrophoresis and staining with ethidium bromide or by spectrophotometry after hydrochloric orcinol reaction (Bial reagent) (Moulé, 1953, Arch. Science Physiol. 7, 161; Mejbaum, 1939, Hope Seyler Z. 258, 117). A plasmid DNA purified according to the method of the invention preferably has a residual RNA concentration of less than 5% (mass/mass), advantageously less than 3%, preferably less than 2% and most preferably less than 1%.



The residual contamination with proteins may be measured by any technique for assaying proteins exhibiting little or no interference caused by the DNA. An appropriate technique is that of the BCA (bicinchoninic acid) technique based on the spectrophotometric detection at a wavelength of 562 nm of the colored complex formed between BCA and the Cu^+ ions derived from the reduction, in an alkaline medium, of cuprous ions Cu^{++} by proteins (Smith et al., 1985, Anal. Biochem. 150, 76-85). A plasmid DNA purified according to the method of the invention preferably has a residual protein contamination of less than 3% (mass/mass), advantageously less than 2%, preferably less than 1% and most preferably less than 0.5%.

The techniques for assaying endotoxins are known to persons skilled in the art. It is possible, for example, to carry out a colorimetric assay derived from the LAL (Limulus Amebocyte Lysate) method recommended by the European Union and United States pharmacopoeias, as used in commercial kits (Bio-Whittaker, QCL-1000, reference L50-647-U; Biogenic, COATEST, reference 82 2387). Preferably, the quantity of endotoxins in the plasmid DNA preparation is less than 50 EU, advantageously less than 20 EU, preferably less than 10 EU and most preferably less than 5 EU per mg of plasmid.

The contaminating chromosomal DNA may be assayed by the competitive quantitative PCR technique based on the amplification of sequences specific to the producing microorganism, by Southern or alternatively by "Slot-blot" with the aid of a specific probe. A plasmid DNA purified according to the method of the invention preferably has a residual chromosomal DNA contamination of less than 5% (mass/mass), advantageously less than 3%, preferably less than 2% and most preferably less than 1%.

A method according to the invention is particularly advantageous as regards the preparation of plasmid DNA having a size greater than 10 kb.



The subject of the present invention is also a pharmaceutical composition comprising a plasmid DNA purified by the method according to the invention as therapeutic or prophylactic agents. A pharmaceutical composition according to the invention may be used in various types of host cells. They are preferably a mammalian cell and in particular a human cell. Said cell may be a primary or tumor cell of hematopoietic origin (totipotent stem cell, leukocyte, lymphocyte, monocyte, macrophage and the like), of hepatic, epithelial or fibroblast origin and most particularly a muscle cell (myoblast, myocyte, satellite cell, cardiomyocyte and the like), a tracheal or pulmonary cell. Moreover, a composition according to the invention may comprise an element for targeting towards a particular cell, for example a ligand for a cellular receptor or alternatively an antibody. Such targeting elements are known.

A composition according to the invention may be administered by the systemic route or by aerosol, in particular by the intragastric, subcutaneous, intracardiac, intramuscular, intravenous, intraperitoneal, intratumor, intrapulmonary, intranasal or intratracheal route. The administration may be made in a single dose or in a dose repeated once or several times after a certain interval of time. The appropriate route of administration and dosage vary according to various parameters, for example the individual or the disease to be treated or alternatively the gene(s) of interest to be transferred. In particular, a pharmaceutical composition according to the invention may be formulated in the form of doses comprising between 0.05 and 100 mg of plasmid DNA purified according to the method according to the invention, advantageously 0.1 and 10 mg and preferably 0.5 and 5 mg. The formulation may also include other compounds such as a pharmaceutically acceptable adjuvant or excipient.

In this context, it may be particularly advantageous to combine the plasmid DNA with a compound



- which enhances its diffusion, especially a polymer or a cationic lipid. By way of examples, there may be mentioned 5-carboxyspermylglycin dioctadecylamide (DOGS), 3 β [N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl]-
- 5 cholesterol (DC-Chol), (2,3-dioleyloctyl-N-[2-(spermine-carboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetate) (DOSPA), spermine cholesterol and spermidine cholesterol (which are described in French application 96 01347).
- 10 Moreover, such a composition may, in addition, comprise an adjuvant capable of enhancing its transfecting power. It may be preferably a neutral lipid such as phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylglycerol and, in
- 15 particular, dioleylethanolamine (DOPE). It is also possible to combine with the plasmid DNA/lipid complex other substances for further enhancing the transfection efficiency or the stability of the complexes.
- 20 A composition according to the invention is in particular intended for the preventive or curative treatment of diseases such as genetic diseases (hemophilia, cystic fibrosis, diabetes or Duchenne's or Becker's myopathies, and the like), cancers, viral
- 25 diseases (hepatitis, AIDS and the like), and recurrent diseases (infections caused by the herpesvirus, the human papillomavirus and the like).
- Finally, the present invention relates to the therapeutic or prophylactic use of a pharmaceutical
- 30 composition according to the invention for the preparation of a medicament intended for the treatment of the human or animal body and, preferably, by gene therapy. According to a first possibility, the medicament may be administered directly *in vivo* (for
- 35 example by intravenous or intramuscular injection, into an accessible tumor, into the lungs using an aerosol, and the like). It is also possible to adopt the *ex vivo* approach which consists in collecting cells from the patient (stem cells from the bone marrow, peripheral



blood lymphocytes, muscle cells and the like), transfecting them *in vitro* according to techniques of the art and then readministering them to the patient.

The invention also extends to a method of treatment using a plasmid DNA obtained by a method according to the invention, according to which a therapeutically effective quantity of the plasmid DNA is administered to a patient requiring such a treatment.

10 The present invention is more fully described with reference to the following figures:

Figure 1 illustrates a chromatogram after gel filtration on Sephacryl S500 (70 ml column, 16 mm in diameter and 350 mm in length) and loading of a 2 ml sample containing 5 mg of pCH110N obtained after alkaline lysis, ultrafiltration and treatment with ammonium sulfate. The elution is carried out at 0.5 ml/min (15 cm/h) in a 10 mM Tris-HCl buffer, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0. The optical density is recorded at 254 nm.

Figure 2 is a schematic representation of the vector pTG11025 containing the gene conferring resistance to kanamycin (kana), the replication origin of ColE1, the cytomegalovirus CMV promoter (pCMv), the intron of the gene encoding Hydroxy-Methylglutaryl-Coenzyme A Reductase (HMG), the cDNA encoding dystrophin and a sequence for polyadenylation of the RNAs transcribed (pA).

Figure 3 illustrates a chromatogram after gel filtration on Sephacryl S500 (5-liter column 8.5 cm in diameter and 82 cm in length) and loading of 125 ml sample containing 85 mg of pTG11025. The elution is carried out at about 15 ml/min (14.5 cm/h) in a 10 mM Tris-HCl buffer, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH 8.0.

Figure 4 illustrates the gradual removal of the endotoxins from an alkaline lysate by 3 successive extractions with 1% or 3% Triton™ X-114 followed by ethanol precipitation.



Figure 5 illustrates the selective precipitation of the contaminating RNAs of an alkaline lysate in the presence of increasing molarities of ammonium sulfate (0 to 3.2 M final).

5 Figure 6 illustrates the selective precipitation of the contaminating RNAs of an alkaline lysate in the presence of increasing molarities of calcium chloride (10 to 100 mM). The final molarity of CaCl_2 is indicated under the relevant lines. S =
10 deposition of a fraction of the sample of soluble material obtained after treatment with CaCl_2 ; I. = deposition of a fraction of the sample of insoluble material obtained after treatment with CaCl_2 ; oc =
15 plasmid DNA in circular form (open circle); sc = plasmid DNA in supercoiled form (super coiled); a = RNAs.

The examples which follow illustrate only an embodiment of the present invention.

20 EXAMPLES

The solutions defined below were prepared from stock solutions or chemical products obtained commercially.

25

EXAMPLE 1: Purification of the plasmid pCH110N from the transformed *E. coli* MC1061 strain

1. Preparation and amplification of the recombinant
30 cells

Use is made of the *E. coli* MC1061 strain (Wertman et al., 1986, *supra*) and of the plasmid pCH110N. It is a plasmid of 8.5 kb whose retention in
35 *E. coli* is brought about by a replication origin (ColE1) and a gene for resistance to ampicillin, both derived from pBR322. The gene of interest consists of the *E. coli* β -galactosidase reporter gene whose expression can be easily detected by staining with



X-Gal(4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside). It is provided in its 3' portion with a sequence encoding a eukaryotic nuclear localization signal. The nuclear localization of the recombinant β -galactosidase makes it possible to eliminate the problems of background noise generated by cross-reaction with the endogenous β -galactosidase of the host cell which is also detectable by Xgal, and therefore to bring about a specific detection of the enzymatic activity resulting from the transfixed plasmid. The expression of the reporter gene is directed by the SV40 early promoter.

The MC1061 cells are made competent by treating with calcium chloride and transformed with the plasmid pCH110N. The recombinant bacteria are selected on a selective medium. A clone is chosen by examining the restriction profiles from which a primary glycerol stock is constituted.

After inoculation of a preculture in a flask, it is used to inoculate a fermenter. The fermentation was carried out continuously (batch) in 18 liters of a 2 times concentrated LB medium (2xLB) without addition of a carbon substrate, at 37°C and in the presence of ampicillin (100 μ g/ml). The culture is collected after 2 hours in the stationary phase. Under these conditions and for a final optical density OD₆₀₀ of 7.5, 180 g of total biomass are obtained.

2 *Harvesting of the wet cell biomass*

The content of the fermenter is distributed into clean and sterile centrifuge bottles (Nalgene, reference 3122-1000, 3122-1010, 3120-1000 or 3120-1010) and the transformed cells recovered by low-speed centrifugation (5000 rpm (revolutions per minute) for 30 min) and at 4°C. It is possible to use a Sorvall RC3 centrifuge equipped with an H6000-A rotor having a capacity of 6x1 liter and to carry out three successive centrifugations in the same bottles in order to harvest the entire culture. After removal of the medium, the



weight of the cellular pellets is estimated by weighing and they can be frozen at -20°C before being treated by the method detailed below. The cells thus harvested constitute the wet cell biomass.

5

3. Preparation of the acidified lysate

The frozen pellet is fragmented and the quantity of biomass which it is desired to treat is collected with the aid of a spatula. In the text which follows, the volumes of the solutions used are given per 27 g of wet biomass. The cells are taken up in 320 ml of resuspension buffer (10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8) previously equilibrated to 4°C and resuspended with the aid of a shearing homogenizer (Ultra Turrax-25 provided with a probe 18 mm in diameter) before being lysed in the presence of 320 ml of lysis buffer (1% SDS, 0.2 M NaOH) equilibrated to 20°C . The lysis is allowed to continue for 5 min at room temperature while gently stirring the preparation by inverting and then 320 ml of acid solution (3 M CH_3COOK , pH 5.5) are added equilibrated to 4°C . The acidified cell lysate is left for 20 min at 0°C while gently stirring regularly by inverting. The final pH is 5.1.

4. Removal of the insoluble matter and concentration of the filtrate

The flocculate is first of all partially removed by low-speed centrifugation (5000 rpm for 30 min at 4°C in a GSA rotor, Sorvall). The supernatant is subjected to two successive filtrations on sintered glass of controlled porosity (16 to $40\text{ }\mu\text{m}$ and then 10 to $16\text{ }\mu\text{m}$; sintered glass Nos. 3 and 4; Schott AG) with the aid of a suction flask connected to a water-jet pump or an equivalent source of vacuum.

The filtrate is subjected to a step of concentration by ultrafiltration on an Easy Flow



cartridge (Sartorius) equipped with a polysulfone membrane with a cut-off of 100 kDa (Sartorius, 0.1 m² reference 14669-OS-1-V or 0.2 m² reference 14669-OS-2-V depending on the volume to be treated). The cartridge
5 is connected to a peristaltic pump and the recirculation flow rate applied is about 400 ml/min. The ultra-filtration is carried out until the final volume is reduced by a factor of 8 to 16. The work is carried out at room temperature in order to reduce the duration of
10 the operation.

The nucleic acids contained in the filtrate are precipitated by addition of 0.7 volume of isopropanol kept at 20°C. The mixture is homogenized by successive
15 inversions, incubated for 5 min at room temperature and the precipitate collected by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min at 4°C (GSA rotor, Sorvall). After removal of the supernatant, the pellet of nucleic acids is washed twice in succession with 50 ml of an
20 80% ethanol solution in water (equilibrated to about -20°C) and again recovered by centrifugation at 10,000 rpm for 15 min at 4°C.

Extraction of the endotoxins

25 The pellet is dried and dissolved in 18 ml of a solution of sodium acetate (0.3 M CH₃COONa in 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) and stored for about thirty minutes at 0°C. 2 ml of a solution of Triton™ X-114 (Sigma; reference X-114™) at 10% (weight/volume) in
30 0.3 M CH₃COONa at pH 5.5 (1% final Triton concentration) are added and the mixture is homogenized by stirring manually. After incubating for 10 min on ice and then for 25 min at 52°C, the bottom phase obtained after centrifugation (SLA 1500 rotor, Sorvall)
35 at 10,000 rpm for 10 min at 35°C is collected and eliminated. Two additional extractions are carried out under the same conditions in the presence of 2.2 ml and 2.4 ml of Triton™ X-114 respectively. The top phase is precipitated by addition of 2.5 volumes of absolute



ethanol at -20°C. After incubating for at least 45 min at -20°C, the precipitate is recovered by centrifugation at 10,000 rpm (SLA 1500 rotor, Sorvall) for 30 min and at 4°C and subjected to 1 or 2 successive washes with an 80% ethanol solution in water stored at -20°C. The centrifugation pellet may be frozen before proceeding to the next step.

Removal of the RNAs

10

The centrifugation pellet is dried under vacuum and taken up in 9.4 ml of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8, at room temperature. Solid ammonium sulfate $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ is added so as to have a final concentration of about 2 M. After mixing by inverting and incubating for 20 min on ice, the mixture is centrifuged for 30 min at 7000 rpm (SLA 1500 rotor, Sorvall) and at 4°C. A second centrifugation under identical conditions is carried out on the supernatant recovered from the first in order to complete the removal of the insoluble matter.

Chromatography on Sephacryl S500

25

The centrifugation supernatant is carefully collected and subjected to gel filtration chromatography on a Sephacryl S500 matrix (Pharmacia; reference 17-0613-01). Under the above-mentioned conditions, a column is used which has a capacity of 1 liter (length 622 mm, diameter 44 mm) developed at 3.8 ml/min (15 cm/h), but of course persons skilled in the art are capable of adjusting the capacity of the column depending on the volume to be treated.

35 The column is equilibrated in 2 volumes of TEN before applying a volume of nucleic acid sample representing 4 to 5% of the volume of the column. The collection and the detection of the fractions are automated (LKB 2212 fraction collector and LKB 2158 Uvicord SD detector equipped with a filter at 254 nm).



The fractions of 3 min are collected and frozen before being analyzed. Figure 1 illustrates a chromatogram obtained on a smaller scale but representative of the method. The plasmid DNA comes out in the exclusion
5 volume whereas the RNA and proteins are retained and appear only later. The clear separation, with a return practically to the base line, obtained between the plasmid DNA peak eluted first and the RNA peak eluted second, may be noted.

10

Conditioning

The fractions containing the plasmid DNA are grouped together and concentrated about 8 x with the
15 aid of an ultrafiltration unit of the Sartocn-Micro type with a polysulfone membrane having a cut-off of 100 kDa (Sartorius, reference 15669-00-1). Alternatively, and when a larger quantity of sample has to be treated, it is possible to use an EasyFlow
20 ultrafiltration unit with a cellulose acetate membrane (20 kDa cut-off, Sartorius, reference 14549-OS-1V).

After concentration, the purified plasmid DNA sample is precipitated by addition of a solution of Na acetate (3 M, pH 5.5) to the final concentration of
25 0.3 M and addition of 2.5 volumes of pure ethanol (99.95%) at -20°C. After incubating at -20°C (30 min), the plasmid DNA is recovered by centrifugation at 10,000 rpm for 30 min at 4°C (SLA 1500 rotor, Sorvall). The pellet is washed with 80% ethanol at about -20°C,
30 and then dried and taken up in the appropriate conditioning buffer (TE, 0.9% NaCl, Hepes Ringer, Lactate Ringer, H₂O; about 20 ml per aliquot of 27 g of cells treated).

After measuring the optical density at 260 nm,
35 the DNA concentration is calculated by taking as base an OD₂₆₀ corresponding to 50 µg/ml. It can then be adjusted to 1.0 mg/ml by diluting with the conditioning buffer, and 20 mg of plasmid DNA are typically obtained per aliquot of 27 g of initial biomass.



EXAMPLE 2: Purification of the plasmid pTG11025
from the transformed E. coli DH10B
strain

5

The E. Coli DH10B Electro Max strain is provided by Gibco BRL (Reference 18290-015). The plasmid pTG11025 (Figure 2) of 18.7 kb carries a marker gene which confers on the bacteria the capacity for resistance to kanamycin (gene encoding an aminoglycoside 3'-phosphotransferase which converts the antibiotic to an inactive derivative) and the ColEI replication origin, these two elements ensuring the retention of the plasmid in the producing strain. It comprises, in addition, a cassette for expression of the cDNA encoding dystrophin under the control of the CMV promoter associated with the HMG intron.

10 The competent DH10B cells are transformed with the plasmid under the conditions recommended by the supplier and a primary glycerol stock is constituted which is stored at -80°C after selection of a recombinant clone. A primary seed batch is used to constitute a preculture in a flask on 2x LB medium in the presence of kanamycin 50 µg/ml. The culture is incubated at 30°C in a thermostatted stirrer (180 rpm) for 14 to 16 hours.

15 After transferring the preculture into an inoculation flask, the transformed strain is propagated in a 20-liter fermenter. The growth takes place at 30°C in a complex culture medium (Hycase SF 37.5 g/l, yeast extract 9 g/l supplemented with growth factors and inorganic salts) using glycerol as carbon substrate (20 g/l) and in the presence of kanamycin (50 µg/ml) for the selection pressure. The pH = 7.0 is regulated by automatic addition of sodium hydroxide (NaOH, 30%) and of sulfuric acid (H₂SO₄, 2 M). Dissolved oxygen is maintained at a saturation greater than or equal to 25% (aeration rate of 1 v.v.m (10.1 min⁻¹) and a variable



stirring rate. It may be advantageous to add kanamycin during culture.

The culture is stopped by cooling at 4°C when the bacteria reach the stationary growth phase. The culture is drawn off and the biomass harvested by centrifugation (Sorvall RC3B centrifuge, 15 min, 4°C, 5000 rpm). The cell pellet is stored at -20°C until the method of purifying the plasmid pTG11025 is applied.

It is similar to the method described in Example 1, except for the following modifications:

- The purification is carried out using 360 g of wet biomass taken up in 3840 ml of resuspension buffer and lysed with an equivalent volume of lysis buffer and then of acid solution.
- The insoluble matter is removed by filtration on sintered glass No. 4 (16-10 µm, Schott AG) before concentrating 15 times on Easy Flow.
- The filtrate is separated into 6 aliquots. The precipitation with isopropanol, the washes with 80% ethanol, the extractions of the endotoxins with Triton™ X-114, the precipitation with ethanol and the subsequent washes with 80% ethanol are carried out on each of the aliquots as described in Example 1.
- The samples are grouped together for the precipitation with ammonium sulfate at a final molarity of 2 M.
- The centrifugation supernatant harvested after the ammonium sulfate precipitation step is loaded onto a Sephacryl-S500 gel filtration column having a volume of 5 liters (length 82 cm, diameter 8.9 cm) developed at a flow rate of 15 ml/min (14.5 cm/h). The chromatogram obtained (Figure 3) shows that the plasmid DNA is eluted in the exclusion volume, whereas the contaminating RNAs and other low-molecular-weight compounds are retained on the column.



- The fractions containing the purified plasmid DNA are grouped together and concentrated by ultrafiltration (factor 10.9). The plasmid DNA is then precipitated by addition of sodium acetate to a final concentration of 0.3 M and of 2.5 volumes of 99.95% ethanol at -20°C.
- The precipitate is collected by centrifugation (10,000 rpm at 4°C, Sorvall SLA 1500 rotor, 30 min) and washed with 200 ml of 80% ethanol.
- After drying under vacuum, the DNA is taken up in the TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) conditioning buffer, its concentration measured by UV spectrometry and adjusted to 1 mg/ml in the same buffer. 145 mg of purified plasmid DNA are typically obtained.

The integrity of the plasmid is evaluated by restriction enzyme mapping and the profiles obtained correspond to what is expected. Moreover, the presence of contaminants is also determined in the final preparation and the results presented below.

Contaminant	Method	Result
Proteins	BCA	0.49% (n=3)
RNA	Bial colorimetric reaction	2.48% (n=3)
Endotoxin	LAL colorimetric method	2.34 EU/mg (n=5)

Moreover, the functionality of the purified plasmid pTG11025 is checked by transfection of cell lines and detection of recombinant dystrophin by immunofluorescence.

Ten µg of purified plasmid DNA are combined with 40 µg of Lipofectin (a mixture of compounds facilitating the transfection of eukaryotic cells) following the instructions of the supplier (Life Technologies, Bethesda, USA, reference 18292-0011), and are then added, in 2 ml of DMEM medium (Life Technologies, Bethesda, USA, reference 11963), to



2.5 × 10⁶ A 549 (human pulmonary adenocarcinoma) cells inoculated the day before in a dish 35 mm in diameter, cultured for 24 hours in the presence of DMEM supplemented with 10% (vol/vol) of fetal calf serum (Life Technologies, Bethesda, USA, reference 10101-061) and previously rinsed with a physiological buffer (1x PBS). Four hours after addition of the DNA, the medium is supplemented with 10% (vol/vol) of fetal calf serum and then the culture is continued for 48 hours. The cells are then fixed by treating at -20°C in a methanol/acetone (1/1) (vol/vol) mixture, air-dried, and incubated in the presence first of an anti-dystrophin monoclonal mouse antibody (Novocastra, Newcastle/Tyme, UK, reference NCL-DYS2) and then of an anti-mouse rabbit antibody (ICN, Costa Mesa, USA, reference 651713) coupled to FITC (fluorescein thioisocyanate); the detailed conditions for these operations are known to persons skilled in the art. The dystrophin produced during the expression of the gene encoded by the vector pTG11025 is detected by fluorescence microscopy examination of the immune complexes. The simultaneous examination of cells transfected in the presence of a control plasmid pTG11025 whose functionality has already been demonstrated, purified according to a standard protocol (Maniatis et al., 1989, *supra*) (positive control) or in the absence of DNA (negative control) makes it possible to evaluate the functional character of the plasmid DNA preparation pTG11025. The amount of fluorescent cells expressing recombinant dystrophin is comparable after transfection with the control pTG11025 and with the plasmid purified by the method according to the invention. Of course, the nontransfected cells show no fluorescence.

35



EXAMPLE 3: Removal of endotoxins using Triton™
X-114

Tests of extractions with Triton™ X-114 were
5 carried out on an alkaline lysate as obtained in
Example 1 in order to determine the optimum
concentrations of Triton™ X-114 to be used and the
number of extractions to be carried out in order to
reduce the level of endotoxins below the tolerated
10 threshold (≤ 2 EU/dose).

To do this, the initial alkaline lysate is
divided into 2 batches subjected to 3 consecutive
extractions in the presence of Triton™ X-114 at a final
concentration of 1 and 3% respectively. The mixture is
15 homogenized, incubated on ice (0°C) for a few minutes,
centrifuged for 5 minutes (12,000 rpm, Eppendorf
centrifuge, reference 5414) at room temperature. After
centrifugation, the bottom phase (Triton™ X-114 and
extracted endotoxins) of each batch is eliminated and
20 the top aqueous phase (Extr. 1; nucleic acids and
remaining endotoxins) again treated as described with
1% or 3% Triton™ X-114 after collection of one aliquot
which serves for assaying the endotoxins (Extr. 2 and
3). After the third extraction, the top phase is
25 precipitated by addition of 2.5 volumes of absolute
ethanol. The precipitate is taken up in 10 mM Tris-HCl,
1 mM EDTA, pH 8 (final).

The level of endotoxins is assayed by a
colorimetric test derived from the LAL method, with the
30 aid of the Biogenic COATEST kit (reference 822387) and
the results presented in Figure 4. A notable reduction
in the level of endotoxins is observed after two
extractions in the presence of 1% Triton. A similar
result is obtained when 3% Triton™ X-114 is used. In
35 the 2 cases, the endotoxin level measured in the final
product is compatible with a pharmaceutical use for an
average dose of 1 mg of plasmid DNA.



EXAMPLE 4: Selective precipitation of the
 contaminating RNAs

5 Selective precipitation tests were carried out
on an alkaline lysate as obtained in Example 1 in order
to determine the optimum ammonium sulfate concen-
trations for precipitating the contaminating RNAs. To
do this, the alkaline lysate is divided into 7 aliquots
which are subjected to precipitation in the presence of
10 an increasing quantity of ammonium sulfate (0.5 M, 1 M,
1.5 M, 2 M, 2.5 M, 3 M and 3.2 M final).

 The precipitated material recovered by
centrifugation and the soluble material are analyzed by
electrophoresis on a 0.4% agarose gel. After staining
15 with ethidium bromide and visualizing by UV fluor-
escence, the plasmid DNA appears in the form of sharp
bands corresponding to the different topoisomers. In
contrast, the RNAs form a very diffuse band which
migrates in the bottom part of the gel.

20 The results illustrated in Figure 5 show that
above a final ammonium sulfate concentration of 1.5 M,
the great majority of RNAs become selectively
precipitated whereas the plasmid DNA remains soluble.
The removal, in the precipitate, of large-sized nucleic
25 acid species retained in the pockets of the analytical
gel, should also be noted.

EXAMPLE 5: Selective precipitation of the
 contaminating RNAs with calcium chloride

30

 The selective precipitation of the RNAs was
also tested in the presence of calcium chloride
(CaCl₂). An alkaline lysate prepared according to the
method described in Example 1, including the step of
35 treatment with Triton™ X-114, was aliquoted into
identical samples to which various volumes of a
concentrated CaCl₂ solution (1 M in this specific case,
but a less concentrated solution, 0.5 M for example,
can be used) are added in order to obtain a final



calcium chloride concentration of 10, 20, 30, 50, 75 or 100 mM, respectively. The soluble and insoluble fractions are separated by centrifugation, and the insoluble pellet is resuspended in a low-ionic strength buffer in the absence of CaCl_2 . The soluble and insoluble samples are analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining of a fraction of sample in order to separate the plasmid DNA (open circular and supercoiled forms) and the contaminating RNAs.

The results (Figure 6) show that above a CaCl_2 concentration of 30 mM, a detectable precipitation of the RNAs is observed. This precipitation becomes substantial and then massive above 50 and 70 mM respectively and then practically complete at 100 mM. The plasmid DNA in its open circular (Open-Circle, migrating less rapidly) and supercoiled (Super-Coiled, migrating most rapidly) forms remains, for its part, predominantly soluble in each of the cases.

EXAMPLE 6: Removal of the colored pigments

The efficiency of the removal of the colored pigments present after the alkaline lysis step (cf. Examples 1, 2 and 5) was evaluated during the steps of concentration by ultrafiltration, of precipitation with isopropanol and of washing with 80% ethanol.

The presence of these pigments results in a yellow color of the crude alkaline lysate before its concentration by ultrafiltration which can be analyzed by measuring the optical density at 340 nm. This absorbance was therefore measured on the samples obtained after the steps of initial ultrafiltration, of precipitation and of washing with isopropanol and with 80% ethanol. Two series of experiments were carried out, one involving filtration of the alkaline lysate on sintered glass, the other on polypropylene cartridge Sartopure PP. The initial lysates are obtained from 150 g of a cell biomass obtained from two fermentations



of the pair *E. coli* strain -DH5 × plasmid pTG11025 (~19 kbp).

5 Experiment No. 1: Macrofiltration carried out on No. 3 sintered glass (16 to 40 µm of porosity - Schott AG

Step	Final volume (ml)	Optical density at 340 nm	Cumulative pigment yield	Cumulative removal factor (X)
Initial crude lysate	5340 ml	0.29	100%	1 X
Post macrofiltration	5260 ml	0.28	95.1%	1.1 X
Post concentration by ultrafiltration (Easy-Flow 300 kDa, Sartorius)	795 ml	0.38	19.5%	5.1 X
Post alcohol precipitation	432 ml	0.39	10.1%	9.2X

10 Experiment No. 2: Macrofiltration carried out on a cartridge Sartopure PF2 (porosity 8 µm - Sartorius)

Step	Final volume (ml)	Optical density at 340 nm	Cumulative pigment yield	Cumulative removal factor (X)
Initial crude lysate	5200 ml	0.32	100%	1 X
Post macrofiltration	5000 ml	0.31	93.1%	1.1 X
Post concentration by ultrafiltration (Easy-Flow 300 kDa, Sartorius)	790 ml	0.57	27.0%	3.7 X
Post alcohol precipitation	432 ml	0.62	16.1%	6.2X

15 These results show that the steps of ultrafiltration and precipitation with isopropanol contribute to the removal of the pigments by a factor of 4 to 5 × and 1.5 to 2 ×, respectively. Combined, these two steps make it possible to achieve a removal



factor of 6 to 10 X, that is to say a total removal of 80 to 90% of the colored pigments.

5 EXAMPLE 7: Purification of the plasmid pTG11025
 from the E. coli DH5 Library Efficiency
 strain

The *E. coli* DH5 Library Efficiency strain (Life Technologies; ref. 18262-014) is transformed with the plasmid pTG1025 (see Example 2 and Figure 2). The steps of transformation, preparation and harvesting of the biomass are identical to those described in Example 2.

The crude lysate is filtered on a filtration cartridge Sartopure PP2 (Sartorius, ref. 5591302P9-0) at a flow rate of 700 ml/min with the aid of a peristaltic pump. The filtrate is then concentrated on a Millipore Minipellicon II membrane, made of regenerated cellulose of the PL300 type having a surface area of 0.1 m² (ref. P2C300C01) (recirculation flow rate ~400 ml/min, rate of drawing off between 60 and 30 ml/min so as to maintain a mean transmembrane pressure of less than or equal to 0.5 × 10⁵ Pa).

The nucleic acids thus concentrated (815 ml) are treated with isopropanol and with ethanol as described above in Example 2. The endotoxins are removed by three successive extractions with Triton™ X-114. The nucleic acids are precipitated. The residual salts and nonionic detergent are rinsed with the aid of aqueous ethanol.

The nucleic acids are taken up in a 10 mM Tris buffer, 1 mM EDTA, pH 7.5 and the RNAs are specifically precipitated in the presence of 100 mM CaCl_2 final. These RNAs are removed by centrifugation (10,000 rpm, Sorvall rotor, SLA 1500, temperature 20°C, 40 min). The plasmid DNA present in the soluble phase is precipitated by addition of isopropanol and resolubilized in a 10 mM Tris buffer, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, pH 8.



An aliquot of the sample corresponding to 180 g of initial biomass is deposited on a Sephacryl S500 column (volume of 6 l, length 92 cm, diameter 8.9 cm, flow rate of 5 ml/min or ~5 cm/hour. The absorbance of the eluate is monitored at 254 nm. The fractions containing the plasmid DNA are affected immediately after elution of the column dead volume (~2100 ml), whereas those containing the RNAs are harvested after about 2 dead volumes (~4100 ml).

The fractions containing the DNA are then grouped together (volume 1480 ml). The plasmid DNA is concentrated by ultrafiltration on an EasyFlow unit with a cellulose triacetate membrane with a cut-off of 20 kDa (Sartorius, ref. 14549-OS-1V). After precipitation with ethanol in the presence of sodium acetate, the plasmid DNA is washed with 80% ethanol and dried under vacuum and then taken up in a conditioning buffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5, and stored frozen at -20°C.

In order to analyze the quality of this DNA, the following parameters were measured:

Initial biomass:	360 g (wet weight) of pTG11025/DH5LE approximately 1.1 mg of DNA/OD ₆₀₀ .ml)
Final quantity:	120 mg (post final ultrafiltration)
Conditioning:	1 mg/ml in 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5
Contaminating proteins:	< 0.20% (n=1) (*)
Contaminating RNAs:	< 1.0% (n=1) (*)
Endotoxins:	3.7 EU/mg of DNA
Functionality:	Active in transfection <i>in vitro</i>
Structure:	Conform by restriction analysis
Yield:	~30%

(*) values < the quantification limits for the assays.



It will be understood that the term "comprises" or its grammatical variants as used in this specification and claims is equivalent to the term "includes" and is not to be taken as excluding the presence of other elements or features.

39
27



THE CLAIMS DEFINING THE INVENTION ARE AS FOLLOWS:

- 1 Method for preparing large scale plasmid DNA from a wet cell biomass harvested after fermentation of a producing cell comprising said plasmid DNA, characterized in that it comprises the following steps:
 - (a) alkaline lysis of the resuspended biomass, after resuspension of the wet cell biomass
 - (b) acidification at a high ionic strength,
 - (c) removal of the insoluble matter,
 - 10 (d) reduction of the endotoxins by a factor of at least 100 in the presence of a detergent,
 - (e) reduction of the ribonucleic acids (RNA),
 - (f) gel filtration chromatography after step (d), and
 - 15 (g) conditioning.
- 2 Method according to claim 1, characterized in that the alkaline lysis step is carried out in the presence of sodium hydroxide and sodium dodecyl sulfate (SDS).
- 3 Method according to claim 1 or 2, characterised in that the acidification step is carried out in the presence of potassium acetate at a final pH of about 5.1.
- 4 Method according to one of claims 1 to 3, characterized in that the step of removing the insoluble matter comprises at least one macrofiltration step.
- 25 5 Method according to claim 4, characterized in that it comprises two to three successive macrofiltration steps on filters of decreasing porosities below 100 μm , 40 μm and/or 16 μm .
- 6 Method according to claim 4, characterized in that it comprises a single macrofiltration step carried out on a cartridge having a porosity equal to 8 μm or to 3 μm .
- 30 7 Method according to one of claims 1 to 6, characterized in that the endotoxin reducing step comprises at least one extraction step in the presence



of a detergent having a cloud point of between 15°C and 35°C, advantageously 18°C and 30°C and preferably 20°C and 25°C.

8. Method according to Claim 7, characterized in
5 that the endotoxin reducing step comprises 1 to 3 successive extractions carried out in the presence of 1 to 3% final of said detergent.

9. Method according to Claim 7 or 8, characterized in that the detergent is chosen from polyoxyethylenes.

10 10. Method according to Claim 9, characterized in that the detergent is Triton™ X-114.

11. Method according to one of Claims 7 to 10, characterized in that the endotoxin reducing step is followed by an alcohol precipitation step.

15 12. Method according to one of Claims 1 to 11, characterized in that the RNA reducing step comprises a selective precipitation of the RNAs under high-ionic strength conditions.

13. Method according to Claim 12, characterized in
20 that the selective precipitation is carried out in the presence of ammonium sulfate at a final concentration of between 2 and 2.5 M.

14. Method according to Claim 12, characterized in
25 that the selective precipitation is carried out in the presence of calcium chloride at a final concentration of between 10 mM and 2 M, advantageously between 20 mM and 0.5 M, and preferably between 50 mM and 0.1 M.

15. Method according to one of Claims 1 to 14, characterized in that the gel filtration chromatography
30 step is carried out on a support having an exclusion limit greater than or equal to 20×10^6 Da.

16. Method according to Claim 15, characterized in that the support is selected from the Sephacryl S500, Sephacryl S1000 and GF2000 supports.

35 17. Method according to one of Claims 1 to 16, characterized in that the conditioning comprises a sterilizing filtration step.

18. Method according to one of Claims 1 to 17, characterized in that it comprises, in addition,



between steps c) and d), d) and e) and/or e) and f), a concentration step optionally followed by a step of alcohol precipitation and resuspension in aqueous phase.

5 19. Method according to Claim 18, characterized in that the concentration step is carried out by ultrafiltration on a membrane having a cut-off of between 20 and 300 kDa.

10 20. Method according to Claim 19, characterized in that the concentration step is carried out by ultrafiltration on a membrane having a cut-off of between 30 and 100 kDa.

15 21. Method according to one of Claims 1 to 20, characterized in that the plasmid DNA included in said producing cell is a recombinant plasmid DNA comprising a gene selected from the genes encoding a cytokine, a cellular or nuclear receptor, a ligand, a coagulation factor, the CFTR protein, insulin, dystrophin, a growth hormone, an enzyme, an enzyme inhibitor, a polypeptide
20 with antitumor effect, a polypeptide capable of inhibiting a bacteria, parasitic or viral infection and especially an HIV infection, an antibody, a toxin, an immunotoxin and a marker.

22. Method according to one of Claims 1 to 21 for
25 the preparation of a plasmid DNA greater than 10 kb in size.

23. Method according to one of Claims 1 to 22, characterized in that the wet cell biomass is harvested by fermentation of an *Escherichia coli* strain
30 comprising a recombinant plasmid DNA.

24. Method according to Claim 23, characterized in that the *Escherichia coli* strain is selected from the strains DH5, DH10B and MC1061.

25. Method according to one of Claims 1 to 24,
35 characterized in that it comprises the following steps:

a) resuspension of the wet cell biomass,



- b) alkaline lysis of the resuspended biomass obtained in step a) in the presence of sodium hydroxide and SDS,
 - 5 c) acidification of the alkaline lysate obtained in step b) in the presence of potassium acetate to a final pH of about 5.1,
 - d) removal of the insoluble matter by macrofiltration of the acidified lysate obtained in step c),
 - 10 e) concentration of the filtrate obtained in step d) by ultrafiltration on a membrane having a cut-off of between 20 and 300 kDa, preferably between 30 and 100 kDa, and alcohol precipitation followed by resuspension of the precipitate in aqueous medium,
 - 15 f) reduction of the endotoxins in the resuspended precipitate in step e) by extraction in the presence of Triton™ X-114 followed by alcohol precipitation and resuspension of the precipitate in aqueous medium,
 - 20 g) reduction of the RNAs in the resuspended precipitate obtained in step f) by selective precipitation in the presence of ammonium sulfate or calcium chloride,
 - 25 h) gel filtration chromatography of the supernatant obtained in step g) on a Sephacryl S500 support,
 - i) concentration of the fractions containing said plasmid DNA which are obtained in step h) by ultrafiltration on a membrane having a cut-off of between 20 and 300 kDa, preferably between 30 and 100 kDa, and alcohol precipitation, and
 - 30 j) conditioning by resuspension of the precipitate obtained in step i) in a pharmaceutically acceptable buffer followed by sterilizing filtration and division into doses.
- 35 26. Pharmaceutical composition comprising a plasmid DNA purified by the method according to one of Claims 1 to 25.
27. Pharmaceutical composition according to Claim 26, comprising, in addition, a lipid compound.



- 28 Pharmaceutical composition according to claim 27, characterized in that the lipid compound is chosen from 5-carboxyspermylglycin dioctadecylamide (DOGS),
3β [N-(N',N'-dimethylaminoethane) carbamoyl]
5 cholesterol (DC-Chol), (2,3-dioleyloctyl-N-[2-(sperminecarboxamido)-ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminium trifluoro-acetate) (DOSPA), spermine cholesterol and spermidine cholesterol.
- 29 Pharmaceutical composition according to one of
10 claims 26 to 28, comprising, in addition, an adjuvant capable of enhancing the transfecting power of said pharmaceutical composition.
- 30 Pharmaceutical composition according to claim 29, characterized in that said adjuvant is a neutral
15 lipid and especially dioleylephosphatidylethanolamine (DOPE).
- 31 Use of a pharmaceutical composition according to one of claims 26 to 30, for the preparation of a
20 medicament intended for the treatment of the human or animal body by gene therapy.
- 32 A method of treatment for the human or animal body by gene therapy comprising administration of an effective amount of a pharmaceutical composition according to one of claims 26 to 30.
- 25 33. Method according to one of claims 1 to 6, characterized in that the endotoxin reducing step comprises at least one extraction step in the presence of a detergent having a cloud point of between 20°C and 25°C.



- 34 Method according to claim 12, characterized in that the selective precipitation is carried out in the presence of calcium chloride at a final concentration of between 50mM and 0.1M.
- 5 35 A method according to any one of claims 1 to 24 in which step (d) is conducted before step (e).
- 36 A method for preparing a plasmid DNA from a wet cell biomass harvested after fermentation of a producing cell substantially as herein described with
10 reference to the examples.
- 37 A pharmaceutical composition comprising a plasmid DNA prepared according to claim 33.

15 Transgene S.A.
By its registered patent attorneys
Freehills Carter Smith Beadle

26 February 2001

34
35
36
37



1 / 6

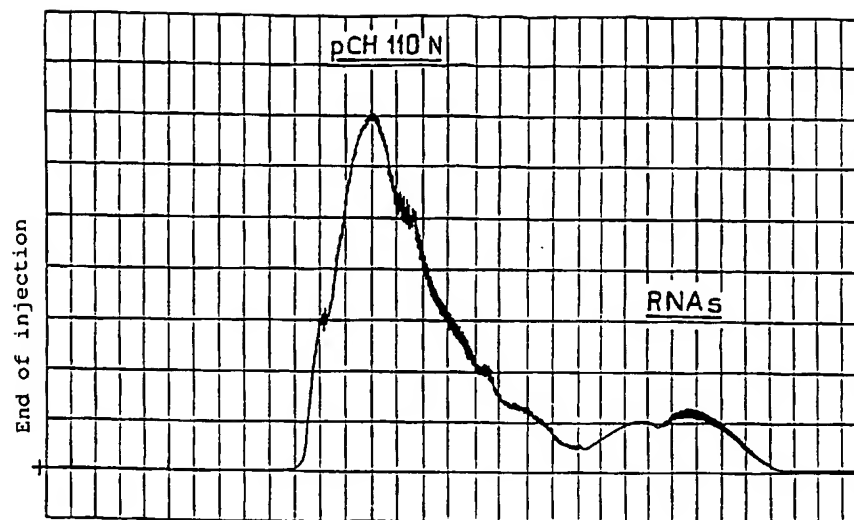
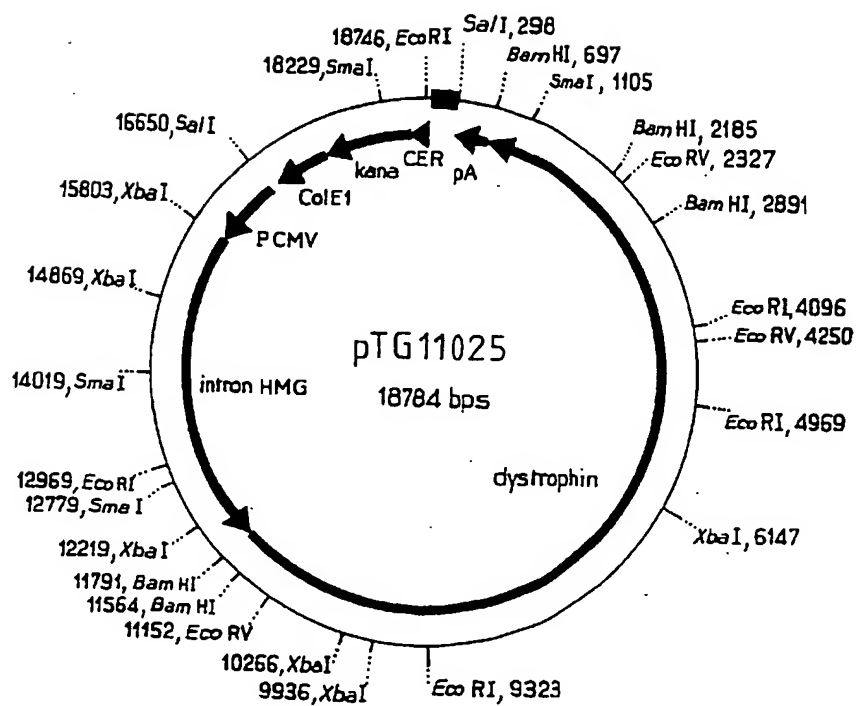


FIG. 1

2 / 6

FIG. 2

3 / 6

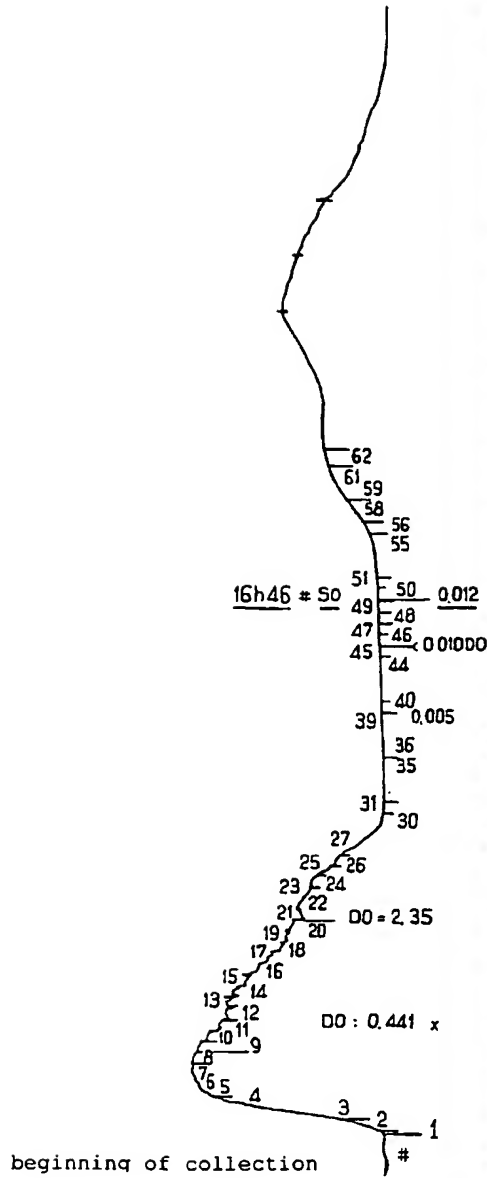
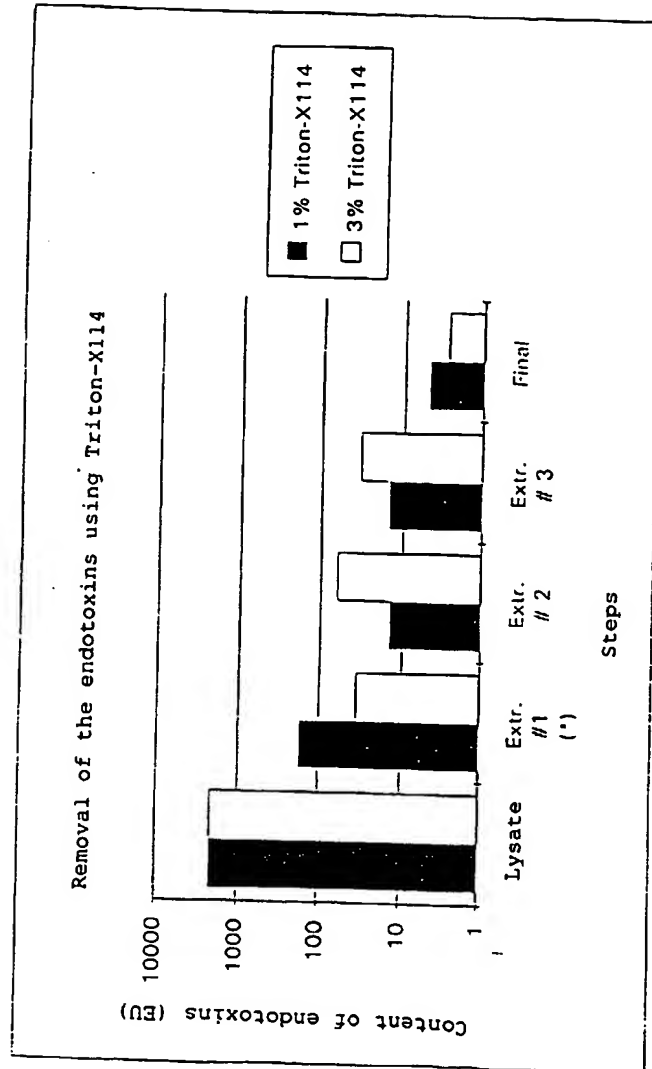


FIG. 3



Legend:

Lysate Initial alkaline lysate

Extr. 1 (*) After the 1st extraction with Triton X-114

Extr. 2 After the 2nd extraction with Triton X-114

Extr. 3 After the 3rd extraction with Triton X-114

Final. Final product after alcohol precipitation

FIG. 4

5 / 6

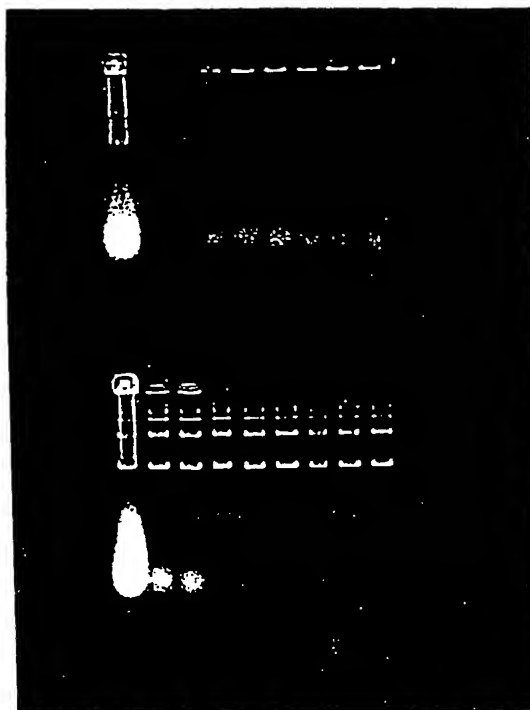
Line	Sample
1	Total alkaline lysate: overload 10 x
2	Total alkaline lysate
3	Precipitation with 0.5 M final ammonium sulfate
4	Precipitation with 1.0 M "
5	Precipitation with 1.5 M "
6	Precipitation with 2.0 M "
7	Precipitation with 2.5 M "
8	Precipitation with 3.0 M "
9	Precipitation with 3.2 M "

1 2 3 4 5 6 7 8 9

Gel No. 1:

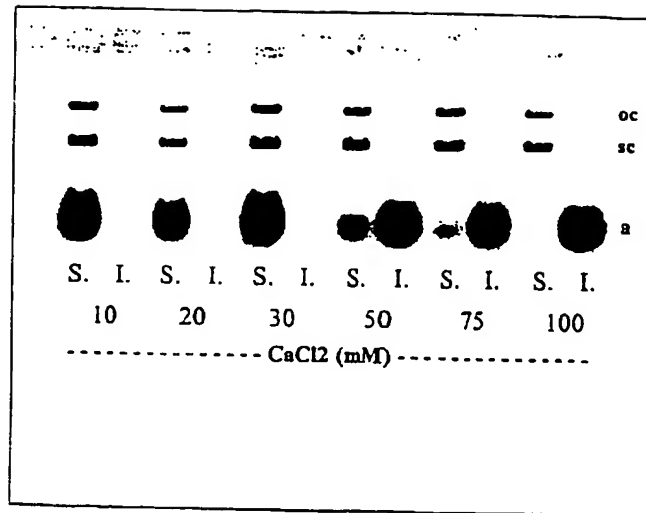
Precipitated material
(RNAs)

Gel No. 2:

Soluble material
(plasmid DNA)FIG. 5

REPLACEMENT SHEET (RULE 26)

6 / 6

FIG. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)